

Die Rückverlagerung des Mougeotia-
Chloroplasten nach der Zentrifugation:
Eine aktive, intrazelluläre Bewegung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

BERTHOLD SCHLÜTER

aus Kneblinghausen

Marburg/Lahn 1976

Druck: Mauersberger, Marburg

Die Rückverlagerung des Mougeotia-
Chloroplasten nach der Zentrifugation:
Eine aktive, intrazelluläre Bewegung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

BERTHOLD SCHLÜTER

aus Kneblinghausen

Marburg/Lahn 1976

Druck: Mauersberger, Marburg



Vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

als Dissertation angenommen am: 27. Januar 1976

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Februar 1976

Berichterstatter:

Prof. Dr. E. Schönbohm

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. G. Throm

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Inhalt:

	Seite
Einleitung	1 - 3
Versuchsobjekt und Anzucht	4 - 6
Methoden der Versuchsdurchführung	6 - 15
Beleuchtungsquellen für die Präparate	6 - 7
Energiesmessung	7
Zentrifugation	8 - 9
Präparatekammern	9 - 14
Begasungsversuche	14
Sauerstoffmessungen	14 - 15
Methoden der Versuchskontrolle und -auswertung	15 - 18
Beleuchtung während der Auswertung	15 - 16
Quantitative Auswertung	17 - 18
Mikrophotographie	18
Experimenteller Teil	19 - 88
Zielsetzung	19
Vorversuche	19 - 35
Ziel der Vorversuche	19 - 20
Theoretische Voraussetzungen	20 - 23
Durchführung der Vorversuche	23 - 35
Schilderung einer Chloroplastenrückverlagerung	36 - 39
Experimente zur Energetik der Chloroplastenstreckung	39 - 64
Theoretische Voraussetzungen	39 - 40
Die Reaktion im DD unter anaeroben Bedingungen	40 - 42
Die Reaktion unter Luftzufuhr nach längerer Anaerobiose in Dunkelheit	42 - 44
Die Reaktion im Weißlicht unter anaeroben Bedingungen nach längerer Dunkelphase	44

Experimente zum Einfluß der Photosynthese	44 -64
Theoretische Grundlagen	44 -47
Die Wirkung der benutzten Hemmstoffe	47 -49
Weißlichtsättigung der Chloroplastenrückverlagerung unter anaeroben Bedingungen	49 -52
Der Einfluß von CO ₂ auf die Chloroplastenrückverlagerung	52 -55
Versuche mit D C M U	55 -61
Experimente mit Antimycin A	61 -62
Experimente mit D B M I B	62 -64
 Experimente zum Problem der unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten	 65 -71
 Experimente zur Bewegungsmechanik	 72 -84
Theoretische Einleitung	72 -77
Colchicin	77
P C M B	77 -80
Cytochalasin B	80 -84
 Anhang	 85 -88
 Diskussion	 89-100
 Zusammenfassung	 101
 Literatur	 102-110

E i n l e i t u n g

Bewegungsvorgänge innerhalb lebender Zellen sind ein allgemeines Phänomen. Schon im vorigen Jahrhundert erkannte man bei Pflanzenzellen außer passiven Verlagerungen von Zellorganellen, wie z.B. Leukoplasten, Mitochondrien u.a. mit der Plasmaströmung lichtorientierte, aktive Chromatophorenbewegungen. SENN (1908) faßte die bis dahin bekannten Ergebnisse zusammen und ergänzte sie durch eigene intensive Studien. In Abhängigkeit von den Außenfaktoren, wie z.B. Licht und Dunkel sind für eine bestimmte Pflanzenart charakteristische Verlagerungen und Anordnungen der Chloroplasten zu beobachten. Die Wahl geeigneter Versuchsobjekte zur experimentellen Analyse dieses Problems wird im wesentlichen durch ein Kriterium bestimmt: Eine bestimmte Chloroplastenanordnung in der Zelle sollte bei gegebenen Außenbedingungen quantitativ erfaßbar und darüber hinaus mikroskopisch analysierbar sein. Damit scheiden bis auf einige Wasserpflanzen fast alle höheren Pflanzen aus; wogegen sich unter den Thallophyten mehrere Objekte für eine erfolgversprechende Analyse anbieten. Es ist bekannt, daß die Anzahl der Chloroplasten pro Zelle wie auch die Form des Chloroplasten für manche Arten charakteristisch sind. Vaucheria, eine siphonale Grünalge besitzt zahlreiche kleine Plastiden; Spirogyra artspezifisch 1 oder wenige Chloroplastenbänder; Mougeotia zeichnet sich durch einen einzigen plattenförmigen Chloroplasten in jeder Zelle aus.

Bei der Wasserpflanze Lemna, einer Blütenpflanze aus der Familie der Lemnaceae, die der Ordnung der Arales angehört, besetzen die linsenförmigen Chloroplasten bei einfallendem Schwachlicht die dem Lichteinfall zugewandte Seite der Zelle, wohingegen sie im Starklicht, etwa direktem Sonnenlicht, sich an den zum Lichteinfall parallelen Wänden anordnen. Der plattenförmige Chloro-

plast der Mougeotia-Zelle kehrt dem einfallenden Schwachlicht die Breitseite, d.h. die größtmögliche Fläche zu und dem direkten Sonnenlicht die schmale kannte. Obwohl die anatomischen Verhältnisse der einzelnen Zellen der beiden genannten Pflanzen recht verschieden sind, reagieren die Chloroplasten doch gleichsinnig: geringe Lichtintensitäten werden effektiv ausgenutzt und zu starkem Lichteinfall wird ausgewichen; darin ist eine Anpassung an den Umweltfaktor Licht zu sehen. Die Pflanzen sind auf den Faktor Licht optimiert.

Jedes lebende System kann auf einen Reiz nur dann reagieren, wenn der Reiz vom betreffenden System aufgenommen, perzipiert wird. Das Problem, den Photorezeptor zu finden, der am Anfang der Reaktionskette für die orientierte Chloroplastenverlagerung steht und wo dieser Rezeptor in der Zelle lokalisiert ist hat seit vielen Jahren zahlreiche Forscher beschäftigt, wobei natürlich die Frage nach der chemischen Struktur des Photorezeptors von größter Bedeutung ist.

Die fädige Grünalge Mougeotia hat sich bereits in zahlreichen Analysen zur lichtorientierten Chloroplastenverlagerung als Objekt sehr bewährt (HAUPT und SCHÖNBOHM 1970, HAUPT 1972). Der Chloroplast dreht sich in der zylindrischen Zelle um seine Längsachse und zeigt dem Beobachter entweder die Breitseite, d.h. die Fläche oder die schmale Kante. Da der Chloroplast bei Belichtung entweder die Fläche oder die Kante zum Licht kehrt und Zwischenstellungen als Reaktion auf den Faktor Licht nicht auftreten, konnte mit Mougeotia die gesamte Analyse der Zusammenhänge zwischen Reiz und Reaktion, d.h. zwischen eingestrahlttem Licht und ausgelöster Bewegung besonders weit vorangetrieben werden. Wie bei allen Vertretern der Zygnematales besteht der Algenfaden aus gleichwertigen und physiologisch selbständigen Zellen, was das Phänomen der Reizleitung von Zelle zu Zelle ausschließt.

Wertvolle Ergebnisse und Zusammenhänge zu diesen Fragen sind von HAUPT und Mitarbeitern sowie von SCHÖNBOHM beigetragen worden. Schon bald erkannte man das Phytochromsystem als Photorezeptor der Schwachlichtbewegung (HAUPT 1959). Die Experimente zur Lokalisierung des Phytochroms haben u.a. zu der Aufstellung von Hypothesen zur Richtungsperzeption und zum Hellrot-Dunkelrot-Antagonismus geführt, Hypothesen die durch zahlreiche Ergebnisse gestützt werden (HAUPT und SCHÖNBOHM 1970, HAUPT 1972). Während die Untersuchung des Photorezeptorproblems nach wie vor Gegenstand vieler Arbeiten ist, so sind in Ergänzung dazu bereits Experimente zur E n e r g e t i k der Chloroplastenbewegung durchgeführt worden (FETZER 1963, SCHÖNBOHM 1969a, 1970).

Mougeotia erwies sich auch als geeignet, den dritten Problemkreis, nämlich die M e c h a n i k experimentell zu bearbeiten. SCHÖNBOHM (1969 b, 1970, 1973 a,b, 1975) führte Untersuchungen zur Mechanik durch unter Verwendung von Hemmstoffen sowie der Methode des differentiellen Interferenz-Kontrasts.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, einen weiteren Beitrag zum Problem der intrazellulären Chloroplastenbewegung bei Mougeotia zu leisten. SCHLÜTER (1973) konnte zeigen, daß die Entfaltung des Chloroplasten nach erfolgter Zentrifugation eine aktive, intrazelluläre Bewegung ist. In dieser Arbeit sollen Fragen der Energetik sowie neue Befunde zum noch wenig geklärten Problem der Mechanik durch die Analyse des Verhaltens des Chloroplasten nach der Zentrifugation behandelt werden.

Versuchsobjekt und Anzucht

Die fädige Grünalge M o u g e o t i a spec. aus der Ordnung der Zygnematales diente als Versuchsobjekt. Zwei verschiedene Arten, die nicht näher bestimmt werden konnten, da sie unter den gewählten Kulturbedingungen keine sexuelle Fortpflanzung zeigten, wurden benutzt: "Stamm Tübingen" und "Stamm Erlangen". Ein wichtiges Merkmal zur Charakterisierung der Arten ist die Wandstruktur der Zygoten. Da es niemals zur Zygotenbildung kam, sollen zur Unterscheidung der Arten die Größenverhältnisse und die Wuchsform angegeben werden:

"Stamm Tübingen"	Durchmesser der Zellen	21 μm
	Länge der Zellen	80-160 μm
"Stamm Erlangen"	Durchmesser der Zellen	29,5 μm
	Länge der Zellen	115-230 μm

Der "Stamm Tübingen" zeigt in der Kultur eine ausgeprägte fädige Wuchsform. Dagegen sind die Algenwatten des "Stammes Erlangen" im allgemeinen kraus, zuweilen sind die Fäden auch lockig gewunden.

Es erwies sich als zwingend notwendig, beide Arten zu verwenden, nachdem bei dem zunächst eingesetzten "Stamm Tübingen" Kulturschwierigkeiten auftraten, die in einer rapiden Zunahme von Bakterienverunreinigungen bestanden. Damit ging eine Schwächung der Algenkulturen parallel, die sich in stark schwankenden Versuchsergebnissen äußerte und nicht selten zum Absterben der Zellen im Langzeitversuch führte. Die vollsynthetische MXS-Nährlösung (s.u.) konnte erfolgreich eingesetzt werden, da hierdurch den Bakterien offensichtlich die optimalen Wachstumsbedingungen entzogen wurden. Als Dauerkultur wächst allerdings nur der "Stamm Erlangen" in dem vollsynthetischen Nährmedium. Der "Stamm Tübingen" konnte mit dem Nährmedium über einen Zeitraum von mehreren

Wochen behandelt werden, doch erwies sich die Dauerkultur darin als unmöglich.

Im Licht-Dunkel-Wechsel 14:10 (6 h - 20 h Licht : 20 h - 6 h Dunkel) erfolgte die Anzucht in Erddekot-Nährlösung (ENS) nach SCHÖNBOHM (1963) für den "Stamm Tübingen" und in variiertem MXS nach WARIS (1953).

Rezept der variierten vollsynthetischen Nährlösung MXS:

5 ml	KNO_3	0,1 n
5 ml	NaNO_3	0,1 n
5 ml	CaCl_2	0,05 n
2 ml	KH_2PO_4	0,1 n
2 ml	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1 n
5 ml	FeSO_4 -EDTA der Stammlösung nach WARIS	

1 ml Mikroelementlösung der Stammlösung nach WARIS
aufgefüllt mit aq. bidest. auf 1000 ml.

Mit NaOH wurde ein pH von 6,0 eingestellt.

Diese Lösung unterscheidet sich von der MXS nach WARIS durch die Zugabe von NaNO_3 , statt 10 ml KNO_3 0,1 n hier 5 ml NaNO_3 0,1 n + 5 ml KNO_3 0,1 n.

Während der "Stamm Tübingen" nur in ENS-Nährlösung als Dauerkultur zu halten war, wuchs der "Stamm Erlangen" in der vollsynthetischen MXS-Nährlösung ohne Anzeichen von Mangelercheinungen als Dauerkultur üppig.

Auf einen weiteren Unterschied in der Zusammensetzung der beiden Lösungen muß hingewiesen werden: Die MXS-Nährlösung enthält primär zur Chelatisierung des zweiwertigen Eisens EDTA. Äthylen-diamin-tetra-essigsäure bildet aber nicht nur mit Fe^{++} einen Komplex, sondern auch mit anderen zweiwertigen Kationen wie dem Ca^{++} . Es wird auch von Wechselwirkungen der EDTA mit Phytochrom berichtet (PRATT 1975).

Dieser Effekt könnte auch bei Mougeotia eine Rolle spielen, denn es ist bekannt, daß die lichtorientierte Chloroplastenbewegung eine Phytochrom-gesteuerte Reaktion ist.

Die MXS-Lösung ist wegen der definierten Zusammensetzung

für Hemmstoffversuche geeignet, wogegen die ENS-Lösung durch die Lauberde-Extraktion in dieser Hinsicht in ihrer Zusammensetzung als unbekannt angesehen werden muß, also Reaktionen des jeweiligen Hemmstoffes mit Komponenten der Nährlösung nicht ausgeschlossen werden können. Versuche im Nährlösungsdurchfluß konnten nur mit MXS-Lösung erfolgen, da die ENS-Lösung wegen der darin enthaltenen Eiweiße zu schäumen begann.

Als Kulturgefäße dienten Petrischalen unterschiedlichen Durchmessers (5, 7 und 9 cm) je nach Versuchsbedarf. Die Nährlösungen wurden alle 7 - 10 Tage gewechselt, indem die verbrauchte Lösung mit einer Pipette abgesaugt und frische Lösung zugetropft wurde. Es erwies sich als vorteilhaft, die Algenwatten in den Kulturschalen nur leicht mit Lösung zu überschichten und somit ein Flotieren der Algen zu vermeiden. Dadurch wurde das fädige Wachstum der Algenwatten deutlich begünstigt. Ein Wechsel der Anzuchtschalen erfolgte etwa bei jedem 3. Nährlösungswechsel, also alle 3 - 4 Wochen.

Die Temperatur betrug $18,0 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Vier Glühlampen 15 Watt lieferten eine Beleuchtungsstärke von 130 - 150 Lux. Da die Schalen auf einer weißen Unterlage standen, war die effektive Beleuchtungsstärke höher.- Glühlampen niedriger Wattzahl emittieren einen hohen Dunkelrotanteil. Die Einstrahlung gleicher Beleuchtungsstärke mittels Leuchtstoffröhren erbrachte weniger gute Kulturerfolge.

Methoden der Versuchsdurchführung

Beleuchtungsquellen für die Präparate

Als Lichtquellen dienten Prado-Universal Projektoren der Firma LEITZ, Wetzlar, mit Colorplan 1:2,5/90 mm Objektiven. Über einen Umlenkspiegel konnten die Prä-

parate auf ebener Unterlage bestrahlt werden. Durch Variation des Abstandes vom Spiegel wurde ein quadratisches Leuchtfeld einer Kantenlänge von 9 cm bis 17 cm annähernd homogen ausgeleuchtet. Die Intensitätsschwankungen im Leuchtfeld betrugen maximal 15 %. Da aber nur ein geringer Teil des Feldes, eine Kreisfläche von 15 mm Durchmesser, im Versuch ausgenutzt wurde, konnte für diese Fläche im Zentrum des Gesamtfeldes Homogenität angenommen werden.

Monochromatische Strahlung wurde durch Einlegen von Interferenzfiltern (SCHOTT & GEN, Mainz) in den Filterhalter in Höhe der Diaebene erzeugt.

Wärmestrahlung wurde, falls erforderlich, mit Wärmeabsorptionsgläsern KG 1 eliminiert.

Energiemessung

Die eingestrahlten Energien wurden mit einer Thermosäule in Verbindung mit einem Mikrovoltmeter gemessen. Die Thermosäule CA 1 von KIPP & ZONEN, Delft, Holland hat 3 Blendenöffnungen. Bei der größten Öffnung, mit der ausschließlich gearbeitet wurde, entspricht eine elektromotorische Kraft von 9,2 Mikrovolt einer eingestrahlten Energie von 1 Watt/m^2 oder $1,43 \cdot 10^{-3} \text{ cal/cm}^2/\text{min}$. Der Meßbereich des Voltmeters (Mikrovoltmeter 155, Keithley Instruments GmbH, München) reicht von 1 Mikrovolt bis 1 Kilovolt. Die verlangten Intensitäten wurden in einem Meßbereich zwischen 3 und 300 Mikrovolt abgelesen. Im empfindlichsten Meßbereich mußte das Raumklimaaggregat wegen der Temperaturschwankungen, hervorgerufen durch die zugeführte Kaltluft, kurzzeitig abgeschaltet werden. Anderenfalls waren keine genauen Werte wegen des ständig wandernden Zeigers abzulesen.

Zentrifugation

Die Abbildung 1 zeigt eine Zentrifugationsvorrichtung.

Zentrifugationsvorrichtung

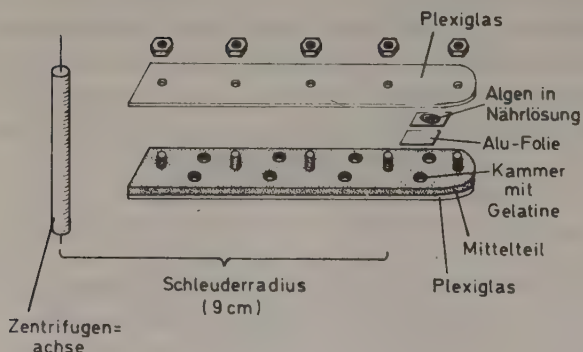


Abb. 1: Zentrifugationsvorrichtung

Die Vorrichtungen sind so bemessen, daß sie genau in die Hülssen der Zentrifuge (HERAEUS Christ, Typ Junior 0) passen. Die gewünschte Tourenzahl wurde in 3 - 4 Sekunden erreicht. Die Bremsung erfolgte mit manueller Unterstützung in ca. 5 Sekunden.

Zur Präparation wurde die Kammer im Mittelteil der Vorrichtung mit 5 %-iger Gelatinelösung gefüllt und ein Plättchen Alu-Folie daraufgelegt. Nach dem Erstarren der Gelatine klebte die Alu-Folie auf dem Mittelteil

fest. Nun wurden die Algenfäden mit Präpariernadeln auf der Folie parallel zum Schleuderradius in einem Tropfen Nährlösung ausgerichtet. Unmittelbar vor der Zentrifugation wurde das obere Plexiglas so aufgelegt, daß die Fäden nicht verlagert wurden und die Vorrichtungen von Hand verschraubt. Die arretierten Algenfäden zwischen Plexiglas und Alu-Folie zeigten keinerlei Schädigungen. Mikroskopisch waren keine Schäden zu erkennen. Eventuelle Schädigungen der Zellen, die nicht im Lichtmikroskop zu erkennen waren, mußten sich im Reaktionsverhalten niederschlagen; dieses wurde jedoch nicht beobachtet.

Nach der Zentrifugation wurden die Algenfäden mit einem Tropfen Nährlösung versetzt und konnten somit schonend und schnell mit Präpariernadeln für den eigentlichen Versuch in die entsprechenden Versuchskammern oder Hemmstofflösungen überführt werden.

Bei der Durchführung der Vorversuche (S.23- 35) wurde die Gelatinekommer mit 5 %-iger Gelatinelösung gefüllt, doch vor dem Erstarren der Lösung bei etwa 25,0 °C wurden die Algen radial ausgerichtet und mit wenig 3 %-iger Gelatine bedeckt. Dadurch konnten die Auswertungen sofort nach Beendigung der Zentrifugation noch in den verschlossenen Vorrichtungen erfolgen.

Präparatekammern

Die zu untersuchende Reaktion dauerte je nach Versuchsbedingungen und Algenmaterial 90 Minuten bis 7 Stunden. Aus diesem Grunde mußte dafür gesorgt werden, daß der Gasaustausch zwischen der die Algen enthaltenden Nährlösung mit der Umgebung nicht eingeschränkt wurde. Deshalb erscheinen Deckglaspräparate für Langzeitversuche problematisch. So mußten Methoden entwickelt werden, die die oben genannten Forderungen erfüllen. Hierbei kamen zur Anwendung

1. die Gewebezuchtammer von WILD (WILD Heerbrugg Mikroskope GmbH, München)

2. die Durchflußküvetten aus Plexiglas

Beide Systeme sind prinzipiell für die Bearbeitung der oben genannten Problemstellung geeignet.

Zu 1. Gewebezuchtkammer (Abb. 2)

Gewebezuchtkammer

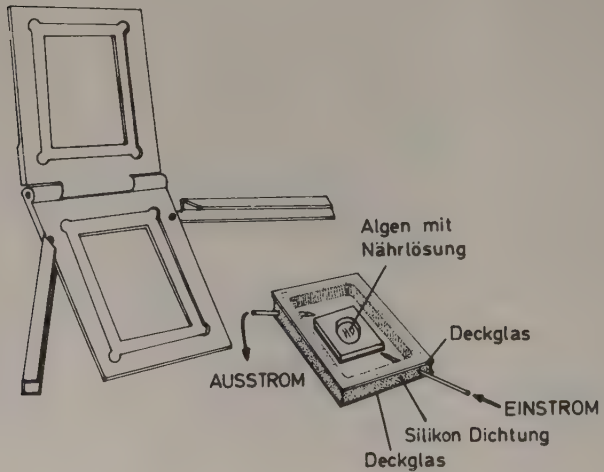


Abb. 2: Gewebezuchtkammer von WILD

Der Metallrahmen der Kammer ist aufklappbar. Der Reaktionsraum wird von einer Silikon-Dichtung luftdicht verschlossen. Mittels feiner Kanülen wurde die Silikon-Dichtung durchstochen und auf diese Weise konnte ein beliebiger Gasstrom hindurchgeleitet werden. Das Gesamtvolumen der Kammer beträgt ca. 1,6 ml. Zwei Deckgläser 24 x 32 mm gestatten die mikroskopische Kontrolle des Reaktionsgeschehens mit einem 10 : 1 Objektiv (= 100-fache Vergrößerung). Die Algen befinden sich in der zentralen Bohrung (10 mm Durchmesser) eines Objektträ-

gerglases, das mit einem Deckglas unterklebt ist. So kann man einen planen Flüssigkeitsspiegel erreichen und dadurch Linseneffekte vermeiden, wie sie an der konvexen Oberfläche eines Tropfens entstehen.

Diese Kammer eignet sich bevorzugt für Hemmstoffexperimente. Da das Flüssigkeitsvolumen in der Bohrung (3 - 4 Tropfen) gering ist, kommt man mit kleinen Hemmstoffansätzen aus, was sich bei teuren Hemmstoffen positiv auswirkt.

Zu 2. Durchflußküvette aus Plexiglas (Abb. 3 und 4)

Durchflußküvette

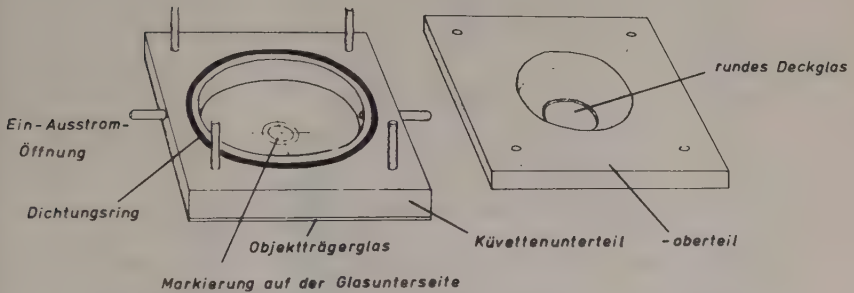


Abb. 3: Durchflußküvette aus Plexiglas, schematisch

Während die Algen in der WILD-Kammer frei in der Nähr- bzw. Hemmstofflösung flotierten, wurden sie in dieser Vorrichtung in ihrer Lage fixiert. Sie wurden zwischen dem runden Deckglas des Küvettenoberteils und einer Klarsichtfolie (HETZEL & Co. Stuttgart, Zellglas Nr. 350),

die mittels eines Klemmringses gespannt wurde, fixiert.

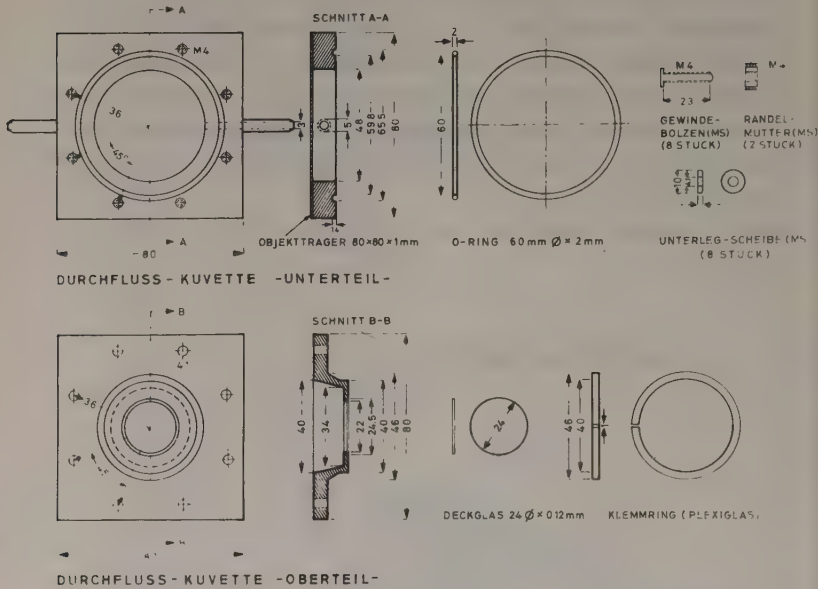


Abb. 4: Durchflußkuvette, Konstruktionszeichnung*

Mit Hilfe der auf der Küvettenunterseite markierten Quadranten ist es leicht möglich, denselben Algenfaden von Auswertung zu Auswertung wiederzufinden. Die Voraussetzungen für eine individuelle Reaktionsmessung, d.h. die Beobachtung einer Einzelzelle über den gesamten Versuchszeitraum, sind damit geschaffen worden.

Die optischen Verhältnisse gestatten die Aufnahme von Mikrophotographien mit einem 40 : 1 Objektiv. Im Hellfeld eines ZEISS-Standard-Mikroskops mit dem Kamera-Aufsatz C 35 wurden die Einzelaufnahmen der Abbildung 15

* Für die Überlassung der Konstruktionszeichnung sei Herrn Dr. J. Pfau gedankt

gemacht. Im polarisationsoptischen wie interferenzkontrastoptischen Verfahren wirkt die Folie störend (depolarisierend).

Für Hemmstoffversuche ist diese Küvette weniger geeignet, da die Folie als zusätzliche Schranke den freien Zutritt des Hemmstoffes in nicht zu kontrollierendem Maße beeinflussen kann. Orientierende Versuche mit unterschiedlichen, gefärbten Ionen rechtfertigen diesen Einwand.- Mit dieser Kammer wurden u. a. die Experimente zur Temperaturabhängigkeit der Rückverlagerung durchgeführt. Durch einen Kühlkreislauf (Abb. 5), bestehend aus einem Kryothermostaten (COLORA, WK 5) und einem Liebig-Kühler, war es möglich, den geschlossenen Kreislauf der Nährlösung, getrieben durch eine Kreiselpumpe (EHEIM, Deizisau, Typ 381) zu temperieren (Temperaturschwankungen $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$).

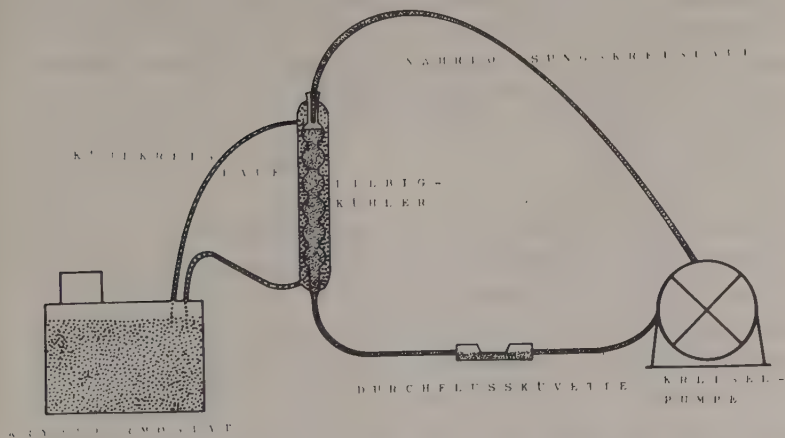


Abb. 5: Kühlkreislauf, schematisch

Sollte diese Küvette in Begasungsversuchen eingesetzt werden, so wurde der Flüssigkeitsstrom durch einen Gasstrom ersetzt. Es war u n m ö g l i c h, einem geschlossenen Flüssigkeitskreislauf (vergl. Abb. 5) den darin enthaltenen Sauerstoff vollkommen zu entziehen.

Begasungsversuche

Die analysenreifeⁿ Gase Stickstoff und Stickstoff-Kohlendioxid-Gemisch lieferte MESSER GRIESHEIM GmbH, Herborn. Für Serienversuche wurde ein N_2 - CO_2 -Gemisch verwendet, das 0,032 vpm CO_2 oder 0,928 Vol.-% CO_2 (Angaben nach Analysen-Certificat) enthielt. Zur Entfernung letzter Sauerstoffspuren passierte der Gasstrom 2 Gaswaschflaschen. Die erste enthielt eine alkalische 30 %-ige Pyrogallol-Lösung, die zweite destilliertes Wasser, um ein Austrocknen der Präparate in den Langzeitversuchen zu verhindern. Wurde mittels einer Aquarienpumpe Luft durch die Waschflaschen gepreßt, so enthielten beide Flaschen destilliertes Wasser. Über Verteilerstücke schlossen sich je nach Versuchsprogramm bis zu 6 Präparatekammern an. Als Schlauchverbindungen dienten neben Silikon- überwiegend PVC-Schläuche.

Sauerstoffmessungen

Die Sauerstoffentwicklung der Photosynthese sowie die Sauerstoffaufnahme der Atmung wurden polarographisch in einem Gilson-Oxygraphen (Gilson Medical Electronics, Middleton, Wisconsin) mit einer Mikro-Clark-Elektrode gemessen. Der sich proportional zur Sauerstoffkonzentration ändernde Polarisationsstrom (-0,8 Volt Polarisationsspannung) wurde zeitabhängig registriert. Die Algenwatte im temperaturkonstanten Reaktionsraum wurde von einem Magnetrührer langsam gedreht, wodurch eine gleichmäßige Durchmischung der Lösung gewährleistet und ein Zerschlagen der Algenwatte vermieden werden konnte.

Die Lichtqualitäten Hellrot (Interferenzfilter Al 664) und Dunkelrot (Interferenzfilter Al 723) wurden quantengleich eingestrahlt ($52 \text{ kerg/cm}^2 \cdot \text{sec}$ bezogen auf 664 nm in der Ebene der Reaktionskammer).

Die Messungen wurden bei 28°C durchgeführt.

Methoden der Versuchskontrolle und -auswertung

Beleuchtung während der Auswertung

Während der Auswertung mußten die Präparate für kurze Zeit grünem Sicherheitslicht (safelight) ausgesetzt werden. Die im Mikroskopfuß befindliche Beleuchtung wurde deshalb mit einer Filterkombination bestehend aus einem

Wärmeschutzfilter KG 1

Gelbglas GG 14

Blauglas BG 18 je 3 mm stark (SCHOTT & GEN.)

abgedeckt. Die resultierende Transmission ist aus der Abbildung 6 zu ersehen (gestrichelte Kurve). Die Transmission liegt im grünen Spektralbereich (vergl. HAUPT 1959)

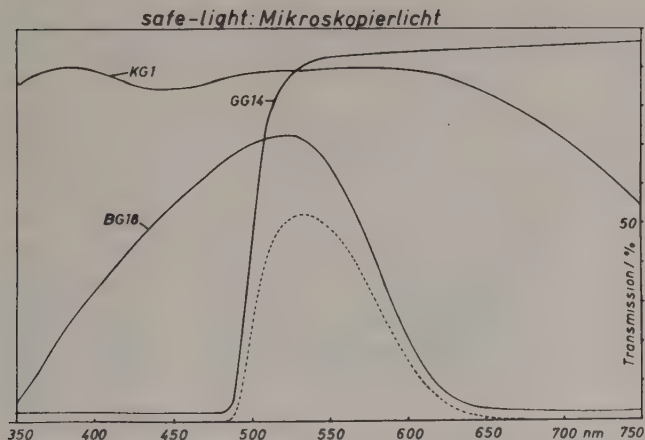


Abb. 6: Spektrale Zusammensetzung der Mikroskopiebeleuchtung

Die Aperturblende des Mikroskopes wurde weitgehend geschlossen, um die Bestrahlung der Präparate während der Auswertung so gering wie möglich zu halten. In Anwendung der unten geschilderten Auswertungsmethode konnte so ein Optimum erreicht werden.

Die Raumbelichtung bestand aus einer Grünlichtröhre PHILIPS T1 20 W 17 in Kombination mit den Plexigläsern 701 und 705 (RÖHM & HAAS GmbH, Darmstadt). Neben der spektralphotometrisch aufgenommenen Transmission der Plexigläser 701 und 705 enthält die Abbildung 7 die aus dem Datenblatt übernommene Emission der Grünlichtröhre (gestrichelte Kurve bzw. Säulen). Die Raumbelichtung wurde nur eingeschaltet wenn unbedingt erforderlich.

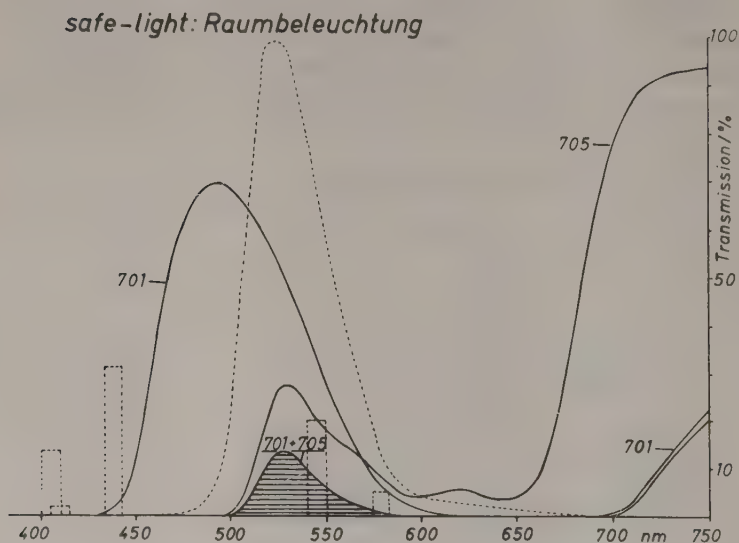


Abb. 7: Spektrale Zusammensetzung der Raumbelichtung

Quantitative Auswertung

Unter der einwirkenden Zentrifugalkraft wird der plattenförmige Chloroplast während der Zentrifugation aufgefaltet, wobei der zentripetal gelegene Zellbereich chloroplastenfrei wird. Dieser Teil der Zelle, bezogen auf die gesamte Länge der Zelle wird im % ausgemessen, bzw. geschätzt und als **Zentrifugationseffekt** der quantitativen Auswertung zugrundegelegt. Zur Erläuterung siehe Abbildung 8.

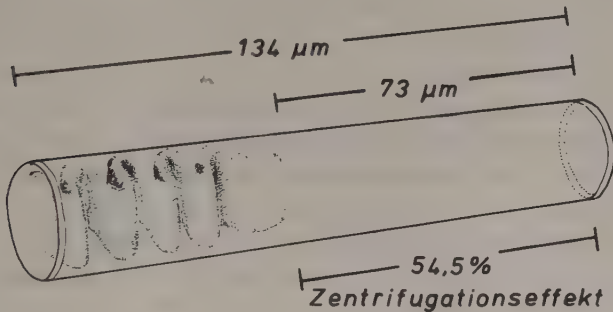


Abb. 8: Modellzeichnung zur Veranschaulichung der Auswertung

Nach vollständiger Streckung beträgt die Reaktion 100 %. In dem dargestellten Fall entspricht die Rückverlagerung des aufgefalteten Chloroplasten um 54,5 m der Zelllänge oder 73 m einer Reaktion von 100 %. Unmittelbar nach der Zentrifugation wurde der Zentrifugationseffekt ermittelt. Je Präparat wurden 50 - 150 Zellen zunächst ausgemessen. Nach einer Einarbeitungszeit von einigen Tagen erwies es sich als zulässig, die Werte zu schätzen. Die Schätzung erfolgte durch die Angabe der Werte in 5 % Intervallen, 10, 15, 20, 25 % usw. Die Überprüfungen der geschätzten Werte durch genaues Abmessen ergaben Übereinstimmung. Um sicher zu sein, daß sich mit der Zeit keine subjektiven Fehlschätzungen einstellten,

wurden regelmäßige Kontrollen während der gesamten Dauer der Experimentierzeit vorgenommen.

Die Einzelwerte wurden auf Band gesprochen und später in Ruhe ausgewertet. Der Einsatz dieser Methode gestattete die Aufnahme umfassender Zahlenwerte und genauer Beobachtungen in einem relativ kurzen Zeitraum. So konnte jedes Präparat nach 1 - 2 Minuten Auswertungsdauer wieder der Versuchsbestrahlung ausgesetzt werden (zur Wirkung des Grünlichts S. 86).

Mikrophotographie

Die in Abbildung 15 gezeigten Einzelstadien der Chloroplastenrückverlagerung wurden mit einem ZEISS-Standard-Mikroskop mit dem Kameraaufsatz C 35 aufgenommen. Der panchromatische Film ORWO NP 15 (VEB Filmfabrik, Wolfen) bewährte sich in zahlreichen weiteren Aufnahmen.

Die Farbtafel auf S. 93 wurde aus Interferenzkontrastaufnahmen zusammengestellt, aufgenommen mit dem ORTHO-LUX mit Interferenzkontrasteinrichtung T und der automatischen Mikroskopkamera ORTHOPLAN (LEITZ, Wetzlar). Die Aufnahmen wurden von Deckglaspräparaten gemacht. Die Einzelbilder A, D, E und G sind Kopien vom Colorumkehrfilm Agfachrome Professional 50 L (Empfindlichkeit 50 ASA); die Einzelbilder B, C und F sind Positive des Color-Negativfilms CNS von Agfa der Empfindlichkeit 80 ASA.

Experimenteller Teil

A Zielsetzung

Der unter der Einwirkung einer Zentrifugalkraft intrazellulär verlagerte, aufgefaltete Chloroplast reagiert, indem er in einer langsam ablaufenden Entfaltung die normale, gestreckte Form wieder einnimmt. In den folgenden Experimenten wird diese aktive Bewegung des Chloroplasten in der Zelle untersucht. Mit verschiedenen Methoden wird versucht, sowohl über den Energiebedarf dieser Reaktion und dessen Deckung wie auch über die Mechanik der Bewegung Klarheit zu schaffen. Bevor dieses Ziel in Angriff genommen werden kann, sind jedoch einige Vorversuche erforderlich.

B Vorversuche

Ziel der Vorversuche

Es ist bekannt, daß der plattenförmige Chloroplast unter der Einwirkung einer gerichteten äußeren Kraft, der Zentrifugalkraft, aufgefalted wird. Das Ziel der Vorversuche ist es, diejenigen experimentellen Bedingungen herauszufinden, die zu einer einheitlichen Chloroplastenfaltung bei niedrigster einwirkender Zentrifugalkraft führen. Die physiologische Reaktionsfähigkeit der Zellen muß erhalten bleiben. Angestrebt wird eine Chloroplastenauffaltung auf etwa die Hälfte der Länge des gestreckten Chloroplasten. Der Zentrifugationseffekt soll also bei 50 % liegen. Wesentlich höhere Zentrifugationseffekte sind nicht erstrebenswert, da nach einer zu starken Auffaltung des Plastiden Verzögerungen im Verlauf der Rückverlagerung nicht

auszuschließen sind.

Theoretische Voraussetzungen

Bevor mit den Vorversuchen begonnen wird, sollen zunächst die wesentlichen Ergebnisse zu diesem Problem zusammengestellt werden.

SCHMIDT (1914) zentrifugierte Spirogyra-Zellen und beobachtete, daß nach der Zentrifugation von 25 Minuten Dauer und einer relativen Zentrifugalbeschleunigung bis zu Extremwerten von $11593 \times g$ der cytoplasmatische Wandbelag erhalten blieb. Am zentrifugalen Ende der Zellen konnte er auch keine Plasmaanhäufungen feststellen. Die Haftfestigkeit des Plasmalemmas an der Zellwand scheint sehr stark zu sein.

VOERKEL (1934) stellte für die Abzentrifugierbarkeit der Plastiden von Funaria eine Abhängigkeit von der Belichtung, die der Zentrifugation vorausgeht, fest. Im ultravioletten und ultraroten Spektralbereich besteht ein Zusammenhang zwischen der strophischen, der lichtorientierten Verlagerung und der Viskositätsänderung des Plasmas. Nach VOERKEL ist die Strahlungsabsorption im sichtbaren Bereich für eine Viskositätsänderung bedeutungslos.

NORTHEN (1938) und NORTHEN & NORTHEN (1938) bearbeiteten dieses Problem an Spirogyra. Für die Verlagerungsgeschwindigkeit des oder der Chloroplasten während der Zentrifugation stellte NORTHEN folgende Gleichung auf: $V = K \cdot (c - c_0)$. Darin ist V die Verlagerungsgeschwindigkeit, K eine Konstante, die einem Term der Stokes'schen Gleichung entspricht, c die angewandte Zentrifugalbeschleunigung und c_0 die Initialstartbeschleunigung, die minimal überschritten werden muß, um eine Verlagerung zu erreichen. Diese c_0 -Werte sind für unterschiedliche Spiro-

*

gyra-Arten verschieden. Der schwankt für verschiedene Zellen (Fäden) einer Art. Für Arten mit mehreren Chloroplastenbändern ist dieser Wert niedriger als für Arten mit nur einem Chloroplastenband je Zelle.

VIRGIN (1951, 1952, 1954) führte detaillierte Untersuchungen an Helodea densa durch. Für die Weißlichtbestrahlung fand er eine Abnahme der Viskosität im schwachen Schwachlicht (0,5 - 1,0 M.C.; meter candle units), eine deutliche Zunahme im mittleren Schwachlicht (100 - 350 M.C.) und eine erneute Abnahme im Starklicht (2200 - 22000 M.C.). Bei der Erarbeitung eines Aktionsspektrums ergab sich im Spektralbereich zwischen 450 und 500 nm das Wirkungsmaximum für die Viskositätsabnahme.

ZURZYCKI (1960) untersuchte an Lemna trisulca die Verlagerungsfähigkeit des einzelnen Chloroplasten in Abhängigkeit von der Bestrahlung vor der Zentrifugation. Dabei diente ihm die Initialstartbeschleunigung, Norton's c_0 , als Meßgröße. Nach ZURZYCKI drückt dieser Wert die Konsistenz des Protoplasmas aus, das den Chloroplasten mit dem Ektoplasma verbindet. Die Konsistenz dieses Plasmabereiches unterliegt breiten Schwankungen. Die Haftfestigkeit und damit die Initialstartbeschleunigung c_0 ist bei einsetzender lichtorientierter Chloroplastenverlagerung am niedrigsten. Die Lockerung der Plastiden in ihrer Lage, Haftpunktlockerung, zeigt die beginnende Chloroplastenumorientierung an.

SEITZ (1970, 1971) fand für die Abzentrifugierbarkeit der Chloroplasten von Vallisneria spiralis, die Photodinese und die lichtorientierte Verlagerung einen Zusammenhang: alle drei Reaktionen werden durch denselben Spektralbereich beeinflusst.

Sehen ZURZYCKI und SEITZ für ihre Objekte Lemna trisulca bzw. Vallisneria spiralis den Zusammenhang zwischen lichtorientierter Chloroplastenverlagerung und Abzentrifugierbarkeit in einer Haftpunktlockerung, die der Ver-

* c_0 -Wert

lagerung vorausgeht, so unterscheidet sich das Verhalten von Mougeotia erheblich.

Die in diesem Zusammenhang von SCHÖNBOHM (1972, 1973 a, 1973 b) dazu beigetragenen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Eine Dunkelphase von 60 Minuten setzt die Haftfestigkeit des Chloroplasten im cytoplasmatischen Wandbelag herab, Weißlicht bewirkt das Gegenteil. Die Weißlichtwirkung eines 45 Sekunden dauernden Lichtstoßes läßt sich nicht unmittelbar nach der Einstrahlung nachweisen. Die maximale Wirkung kann nach 5 Minuten festgestellt werden. Eine Parallelität zwischen maximaler Verankerung und lichtorientierter Chloroplastenbewegung ist gegeben: Während der Chloroplastendrehung ist die Haftfestigkeit am höchsten.

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu denen von ZURZYCKI und SEITZ, die für ihre Objekte Lemna bzw. Vallisneria im Verlauf der lichtorientierten Plastidenverlagerung maximale Erniedrigung des Verankerungsgrades feststellen. Bei den zuletzt genannten Objekten handelt es sich um Blaulichtreaktionen, bei Mougeotia um eine Phytochromreaktion.

Ist bei Mougeotia die Schwachlichtbewegung, die Drehung des Chloroplasten von der Kanten- in die Flächenstellung mit einer stärkeren Bindung des Plastiden im Cytoplasma-Wandbelag gekoppelt, so ist die Verankerung der Plastiden nicht an eine lichtorientierte Drehung gebunden. Die Haftung kann unabhängig davon durch Weißlicht- oder Hellrotbestrahlung gesteigert werden. Die durch 60 Minuten Dunkelheit erreichte Lockerung wird durch parallel zur Zelle schwingendes Hellrot nicht beeinflusst, wohl aber durch quer schwingendes Hellrot. Doch erreicht die Zunahme der Verankerung nicht das Ausmaß wie es durch Weißlicht bewirkt wird. Dunkelrot wirkt nach einer desensibilisierenden, verankernden Weißlichtphase lösend wie eine 60-minütige Dunkelphase.

Dieselbe Sensibilisierung durch Dunkelrot ist auch ohne vorherige Weißlichteinstrahlung zu messen. Die Reaktion auf die Dunkelrotbestrahlung verhält sich zu der nach Hellrotbestrahlung antagonistisch. Die zuletzt gegebene Lichtqualität ist für die Verankerung entscheidend. Hellrot als letzte erhöht die Haftfestigkeit, Dunkelrot zuletzt gegeben setzt sie herab. Es handelt sich um eine phytochromgesteuerte Reaktion.

Blaulicht hoher Intensität ($50 \text{ kerg/cm}^2 \cdot \text{sec}$) wirkt ebenfalls lockernd. Bei niedriger Intensität ($12 \text{ kerg/cm}^2 \cdot \text{sec}$) ist ein Aktionsdichroismus festzustellen, ähnlich dem der tonischen Blaulichtwirkung (SCHÖNBOHM 1968, 1971).

Überblicken wir die angeführten Ergebnisse, dann stellen wir fest, daß die Wirkung des Außenfaktors Licht auf die Wechselbeziehungen zwischen Chloroplast(en) und Cytoplasma sehr verschieden sein kann. Bei Mougeotia kann der Zentrifugationseffekt durch das Phytochromsystem beeinflußt werden; ebenso wie die Chloroplastenverlagerung vom Phytochromsystem gesteuert wird.

Lemna und Vallisneria verhalten sich grundsätzlich anders. Für diese Pflanzen ist der entscheidende Spektralbereich der Blaubereich, der Teil des Spektrums, den die Flavine absorbieren. Flavine sollen Photorezeptoren der intrazellulären Chloroplastenbewegung sein.

Durchführung der Vorversuche

Die ausführlicher aufgezeigten Ergebnisse, die mit Mougeotia als Versuchsobjekt erarbeitet wurden, geben Hinweise auf die Schwerpunkte der Vorversuche, die zur Erreichung des oben genannten Zieles der Vorversuche durchzuführen sind. Es werden Experimente zu folgenden Punkten durchgeführt:

1. Die Wirkung von Weißlicht und Dunkelheit auf die Haftfestigkeit der Chloroplasten des "Stammes Erlangen"
2. Die Abzentrifugierbarkeit in Abhängigkeit von der Zentrifugalbeschleunigung
3. Die Wirkung der Temperatur auf die Abzentrifugierbarkeit
4. Ein Vergleich der phytochromgesteuerten Verankerungsbeeinflussung für die beiden Mougeotia-Arten
5. Die Streuung der Einzelwerte
6. Unterschiedliche Sensibilisierung durch Dunkelheit
7. Der HR - DR-Antagonismus

1. Die Wirkung von Weißlicht und Dunkelheit auf die Haftfestigkeit der Chloroplasten des "Stammes Erlangen"

Abbildung 9 veranschaulicht die Wirkung von Weißlicht A und Dunkelheit B in Abhängigkeit von der Zeit auf die Verankerung der Chloroplasten im Cytoplasma-Wandbelag. Nach 50 Minuten Weißlicht ist die maximale Verankerung erreicht. Die beiden ersten Werte von 50 und 44 % Zentrifugationseffekt sind auf einen Wärmeeffekt zurückzuführen. Bei der Präparation kommt es zu einer Erwärmung der Algen durch die zähflüssige 5 %-ige Gelatine auf über 25 °C. Abbildung 11 bestätigt diese Aussage. In Abbildung 9 B sind die Chloroplasten zunächst durch eine 50 minütige Weißlichtphase 160 Lux verankert worden (vergl. mit den Endwerten in 9 A). Die abnehmende Verankerung während der Dunkelphase ist bereits nach 15 Minuten im Endwert erreicht. Der "Stamm Erlangen" verhält sich also wie der von SCHÖNBOHM untersuchte "Stamm Tübingen".

Wurden die Algen jedoch nach 60 Minuten Dunkelheit vor der Zentrifugation für 3 Minuten dunkelroter Strahlung einer Intensität von $1400 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$ ausgesetzt, so

ist eine starke Zunahme der Verankerung festzustellen. Der Zentrifugationseffekt fällt von 43 auf 22 % für 257 x g (Pfeil, offener Kreis) und von 22 auf 15 % für 200 x g (offenes Dreieck). Der Dunkelrotwirkung wird weiter unten nachgegangen.

Wirkung von Weißlicht und Dunkelheit auf die Haftfestigkeit des Chloroplasten

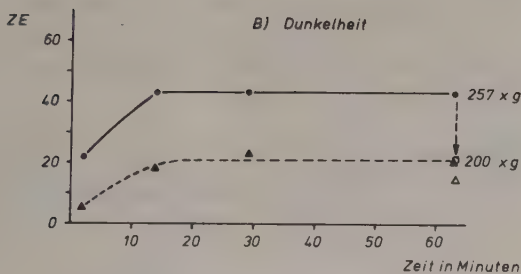
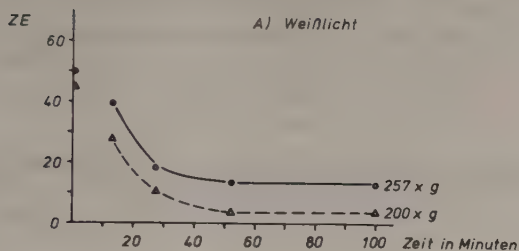


Abb. 9: Wirkung von Weißlicht und Dunkelheit auf die Haftfestigkeit des Chloroplasten ("Stamm Erlangen")

A) Weißlicht 160 Lux

B) vor der Zentrifugation 50 Minuten Weißlicht 160 Lux, danach Dunkelheit

Zentrifugationsdauer 3 Minuten

2. Die Abzentrifugierbarkeit in Abhängigkeit von der Zentrifugalbeschleunigung

Die Chloroplasten des Mougeotia-Stammes Erlangen sind nach einer 40 minütigen Weißlichtphase fest im Cytoplasma-Wandbelag verankert. Es sind entsprechend hohe Zentrifugalbeschleunigungen zur zentrifugalen Verlagerung erforderlich. Abbildung 10 zeigt den Zusammenhang zwischen Abzentrifugierbarkeit und relativer Zentrifugalbeschleunigung bei den genannten Voraussetzungen.

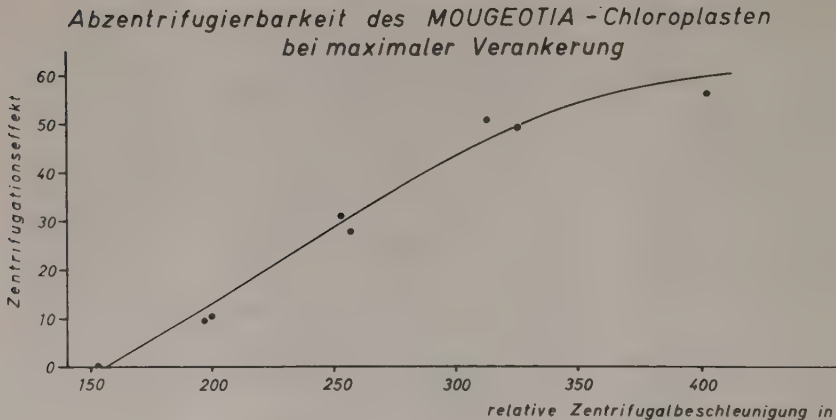


Abb. 10: Abzentrifugierbarkeit des Chloroplasten bei maximaler Verankerung nach 40 Minuten Weißlicht 270 Lux

Chloroplastenverlagerungen werden erst durch Zentrifugalbeschleunigungen oberhalb 160 x g erreicht. Dieser Wert entspricht der Initialstartbeschleunigung c_0 von NORTHERN (1938). Bis zur Auffaltung auf die Hälfte der gestreckten Form, Zentrifugationseffekt 50 %, er-

weist sich die Abhängigkeit von der Zentrifugalbeschleunigung als linear. Darüber nimmt die Kurve einen abflachenden Verlauf. Dieses Verhalten ist zu erwarten, da mit zunehmender Chloroplastenstauchung Wechselwirkungen mit der den Raum limitierenden Zellwand auftreten müssen. Die Kurve nähert sich asymptotisch einem ZE-Wert zwischen 70 und 80 %. Dieser Maximalwert erreichbarer Stauchung ist jedoch für die zu untersuchende Reaktion bedeutungslos. Es sei aber erwähnt, daß derartig zusammengeschleuderte Chloroplasten - die Gestalt ist in diesem Zustand nicht mehr zu identifizieren - zur Formrestitution fähig sind.

3. Die Wirkung der Temperatur auf die Abzentrifugierbarkeit

Mit steigender Temperatur ist innerhalb physiologischer Grenzen (nach WEISENSEEL 1968: 1 - 30 °C) mit einer Abnahme der Plasmaviskosität zu rechnen. Die Ergebnisse der Abbildung 11 bestätigen diese Vermutung.

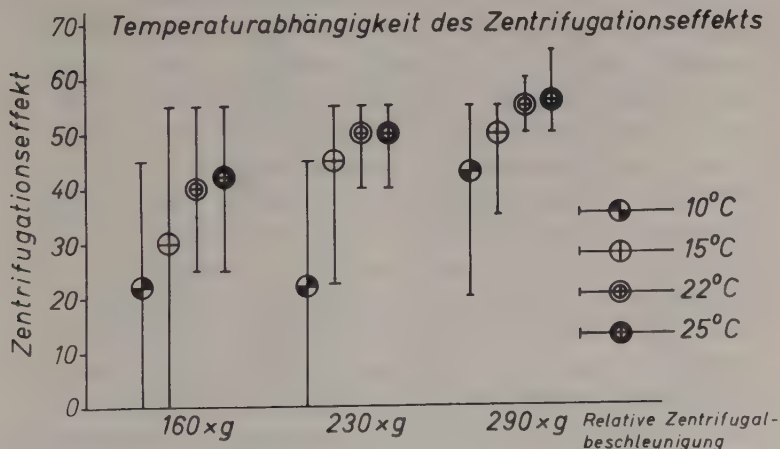


Abb. 11: Temperaturabhängigkeit des Zentrifugationseffekts bei verschiedener Zentrifugalbeschleunigung

Zur Temperaturangleichung wurden die präparierten Zentrifugationsvorrichtungen durch Dunkelheit bei der entsprechenden Temperatur sensibilisiert. Die Symbole geben die Mittelwerte an, die Senkrechten den Umfang der Streuung. Zentrifugationen oberhalb 20 °C begrenzen die Streuung erheblich.

Alle Zentrifugationen wurden deshalb bei 20 - 21 °C Raumtemperatur durchgeführt.

4. Ein Vergleich der phytochromgesteuerten Verankerungsbeeinflussung für die beiden Mougeotia-Arten

Nach einer Sensibilisierung durch eine Dunkelphase wurde durch Bestrahlung mit Dunkelrot eine starke Zunahme der Chloroplastenverankerung beobachtet (vergl. Abb. 9 B). Damit erhebt sich die Frage, ob Dunkelrot generell eine zunehmende Verankerung bewirkt oder hier abweichendes Verhalten im Einzelfall vorliegt. SCHÖNBOHM fand für den "Stamm Tübingen" eine sensibilisierende, lockernde Wirkung durch Dunkelrot.

Abbildung 12 A zeigt den Vergleich der beiden Mougeotia-Arten. Die Säulenpaare 1 - 4 geben das Verhalten des "Stammes Tübingen", die Säulenpaare 5 - 8 das Verhalten des "Stammes Erlangen" nach 60 Minuten Weißlicht 200 Lux und 60 Minuten Dunkelheit auf HR- und DR-Bestrahlung wieder. Nach Weißlichtbestrahlung zeigt der "Stamm Tübingen" keinen Unterschied zwischen der DR- und HR-Bestrahlung (Säulen 1 und 2). Dagegen bestätigen die Säulenpaare 3 und 4 die Ergebnisse von SCHÖNBOHM. DR (Säule 3) wirkt sensibilisierend, lockernd, HR (Säule 4) desensibilisierend, festigend. Für den "Stamm Erlangen" gilt das Gegenteil: HR wirkt sensibilisierend, sowohl nach Weißlicht (Säule 5) als auch nach Dunkelheit (Säule 8), DR bewirkt in beiden Fällen eine Verankerung der Plastiden (Säule 6 nach Weißlicht, Säule 7 nach Dunkelheit).

Dieses Ergebnis überrascht. Bei exakt gleicher experi-

menteller Behandlung wird für die beiden Arten konträres Verhalten nachgewiesen.

A Wirkung von HR und DR auf
die Haftfestigkeit des Chloroplasten

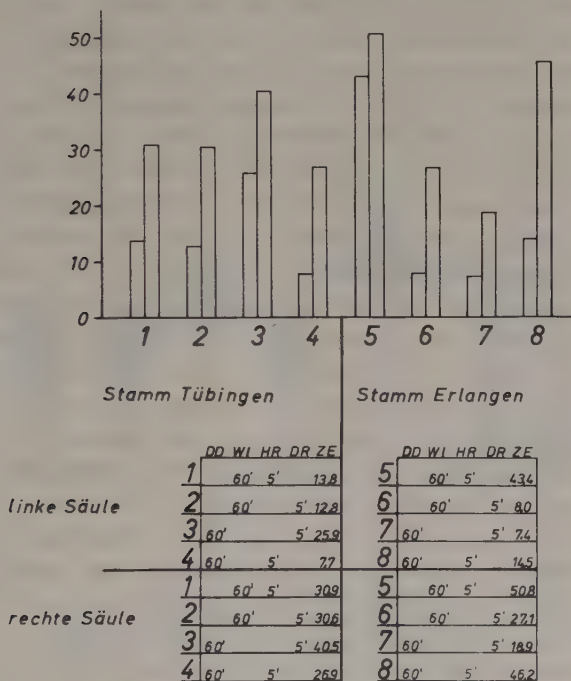


Abb. 12 A: Wirkung von HR und DR auf die Haftfestigkeit des Chloroplasten

Ordinate: Zentrifugationseffekt

Weißlichtintensität 200 Lux

HR Interferenzfilter A1 664 2600 $\text{erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$

DR Interferenzfilter A1 723 2600 $\text{erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$

linke Säule 1-4 253 x g; rechte Säule 1-4 326 x g

5-8 200 x g;

5-8 257 x g

Das Ergebnis läßt die Behauptung, die primäre Phytochromwirkung sei innerhalb einer Algengattung grundsätzlich verschieden, n i c h t zu. Es liegen Hinweise dafür vor, daß die Zeit nach der Phytochrom-Induktion für die zu messende Reaktion, hier die Haftfestigkeit des Chloroplasten im Cytoplasma-Wandbelag, von ausschlaggebender Bedeutung ist (SCHÖNBOHM, mündl. Mitteilung). Möglicherweise laufen die Folgeprozeßketten bei der einen Art schneller ab als bei der anderen. Auf dieses Problem ist in der Diskussion näher einzugehen.

Die dargestellten Ergebnisse wurden an einem Tag ermittelt. Die Präparation wie die gesamte Vorbehandlung und die Zentrifugation verliefen simultan, nur geringfügig zeitverschoben, da es sich als vorteilhaft herausstellte, verschiedene Zentrifugalbeschleunigungen für die verschiedenen Arten anzuwenden. Bei gleicher Dauer von 3 Minuten wurden die Algen vom "Stamm Tübingen" bei 1800 U/min, entspricht einer mittleren relativen Zentrifugalbeschleunigung von $253 \times g$ für Kammer 3 der Zentrifugationsvorrichtung und $326 \times g$ für Kammer 4 und die Algen des "Stammes Erlangen" bei 1600 U/min entspricht einer mittleren relativen Zentrifugalbeschleunigung von $200 \times g$ für Kammer 3 und $257 \times g$ für Kammer 4. Der Grund dürfte in der unterschiedlichen Größe der Zellen und damit in der Chloroplastenmasse zu sehen sein. Die Chloroplasten des "Stammes Erlangen" sind ca. 30 % breiter als die des "Stammes Tübingen" bei gleicher Stärke. Die Relation von Chloroplastenmasse zur Kontaktfläche zum Cytoplasma-Wandbelag ist verschieden.

5. Die Streuung der Einzelwerte

Die Experimente dienten dazu, die Bedingungen zu ermitteln, unter denen ein mittlerer Zentrifugationseffekt von 50 % bei geringster Streuung der Einzelwerte

und schonendster Zentrifugation erreicht werden kann. In Abbildung 12 B ist die Streuung der Einzelwerte in Form von Blockdiagrammen angegeben. Zur Wahrung der Übersichtlichkeit sind nur die rechten Säulen der Säulenpaare der Abbildung 12 A aufgeschlüsselt. Für die linken Säulen ergibt sich prinzipiell dasselbe Bild.

B Streuung der unter **A** dargestellten Mittelwerte
für die rechten Säulen der Säulenpaare

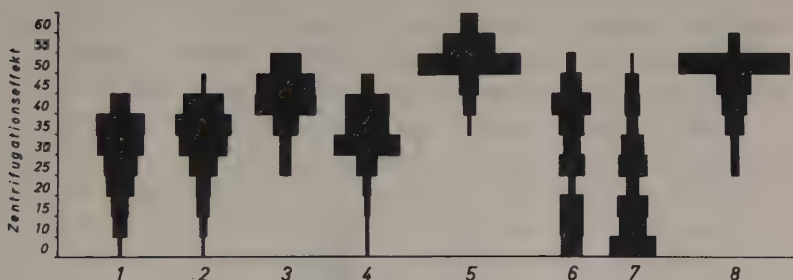


Abb. 12 B: Streuung der in 12 A dargestellten Mittelwerte für die rechten Säulen der Säulenpaare

Block 1-4	1 60 min WL + 5 min HR
"Stamm Tübingen"	2 60 min WL + 5 min DR
	3 60 min DD + 5 min DR
	4 60 min DD + 5 min HR
Block 5-8	5 60 min WL + 5 min HR
"Stamm Erlangen"	6 60 min WL + 5 min DR
	7 60 min DD + 5 min DR
	8 60 min DD + 5 min HR

Für den "Stamm Tübingen" - die Blöcke 1-4 - erweist sich demnach eine Sensibilisierung durch eine Duneckphase und anschließende DR-Bestrahlung als optimal. (Block 3).

Der "Stamm Erlangen" erfährt eine optimale Sensibilisierung durch HR-Bestrahlung, die sich nach desensibilisierendem Weißlicht gegeben (Block 5) stärker auswirkt als nach Dunkelheit (Block 8).

6. Unterschiedliche Sensibilisierung durch Dunkelheit

Die oben genannten Forderungen, einheitlicher Zentrifugationseffekt bei geringer Streuung, werden auch hinreichend durch eine 50 - 60 minütige Dunkelphase allein ohne Rotstrahlung erfüllt für beide Mougeotia-Arten. Beim "Stamm Erlangen" muß allerdings mit unterschiedlichen Sensibilisierungserfolgen gerechnet werden. Folgendes Ergebnis einer Versuchsserie sei dazu angeführt: Algen aus der Kulturschale ER 1 wurden auf ihre Dunkelsensibilisierbarkeit untersucht (Abbildung 13).

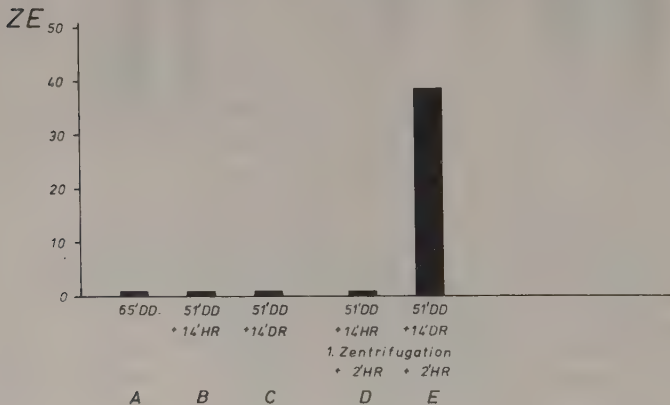


Abb. 13: Dunkelsensibilisierbarkeit der Algen aus der Kulturschale ER 1
Zentrifugationsdauer 3 Minuten bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von $200 \times g$

Abweichend vom erwarteten Ergebnis (s. Abb. 9 B) war eine Lockerung der Chloroplasten nach 65 Minuten

Dunkelheit nicht festzustellen. (Säule A der Abb. 13). Weder HR (Säule B) noch DR (Säule C) der Intensität von $2600 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$ bewirken eine Änderung. Darum wurden die zentrifugierten Algen sofort erneut in der verschlossenen Zentrifugationsvorrichtung mit HR bestrahlt, diesmal mit der Intensität von $10800 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$. In dem Präparat, das zuvor mit DR bestrahlt wurde (Säule E) konnte eine hohe Lockerung festgestellt werden. Auf das zuvor mit HR bestrahlte Präparat hat die 2. Hellrotbestrahlung keinen Einfluß, die Verankerung war unverändert hoch (Säule D).

7. Der HR - DR- Antagonismus

In den Vorversuchen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß sich die beiden Mougeotia-Arten gegenüber HR und DR antagonistisch verhalten. Der "Stamm Tübingen" weist nach DD + DR maximale Lockerung auf, der "Stamm Erlangen" nach WL + HR bzw. DD + HR (vergl. Abb. 12 A). Es sollte versucht werden, für den "Stamm Erlangen" dieselbe antagonistische Phytochromwirkung nachzuweisen, wie sie für den "Stamm Tübingen" gefunden wurde (SCHÖNBOHM 1973b). Weitere Versuche zum Nachweis eines HR-DR-Antagonismus führten zu den in Abbildung 14 wiedergegebenen Resultaten. Mit zunehmender Weißlichtdauer wird nach 50 Minuten (Säule C) maximale Haftung registriert, die durch eine 3-minütige HR-Bestrahlung aufgehoben werden kann (Säule D). Das Verhalten auf alternierende HR-DR-Bestrahlung ist durch die Säulen E - H dargestellt. DR zuletzt gegeben erhöht die Verankerung (E und G), HR zuletzt gegeben führt zu einer Abnahme der Verankerung (F und H). Damit konnte gezeigt werden, daß auch für den "Stamm Erlangen" der HR-DR-Antagonismus wirksam ist.

Die schwächste in allen Versuchen eingestrahlte Rotintensität betrug $1400 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$. Bei einer Bestrahlungsdauer von 3 Minuten konnten befriedigende Sensi-

HR-DR - Antagonismus

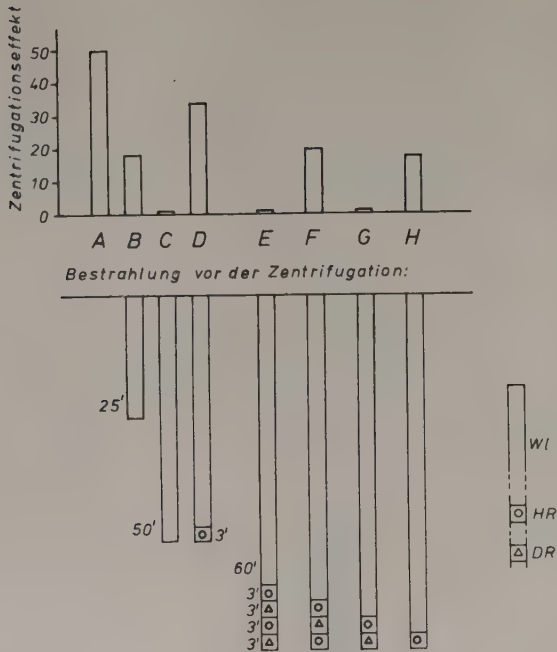


Abb. 14: HR-DR-Antagonismus "Stamm Erlangen"

HR Interferenzfilter Al 664 $2600 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$
 DR Interferenzfilter Al 723 $2600 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$
 Zentrifugationsdauer 3 Minuten bei $200 \times g$

bilisierungen erreicht werden. Längere Bestrahlungszeiten erbrachten keine Steigerung. Eine genaue Intensitäts-Zeit-Beziehung konnte im Rahmen des Themas nicht erarbeitet werden. Es scheinen jedoch wesentlich kürzere Zeiten voll wirksam zu sein. Die höchste eingestrahlte HR-Intensität zum Zweck der Sensibilisierung

betrug $11000 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$. Die eingestrahlten Energien waren im Hinblick auf das Phytochromsystem saturierend.

Schilderung einer Chloroplastenrückverlagerung

Chloroplastenrückverlagerung

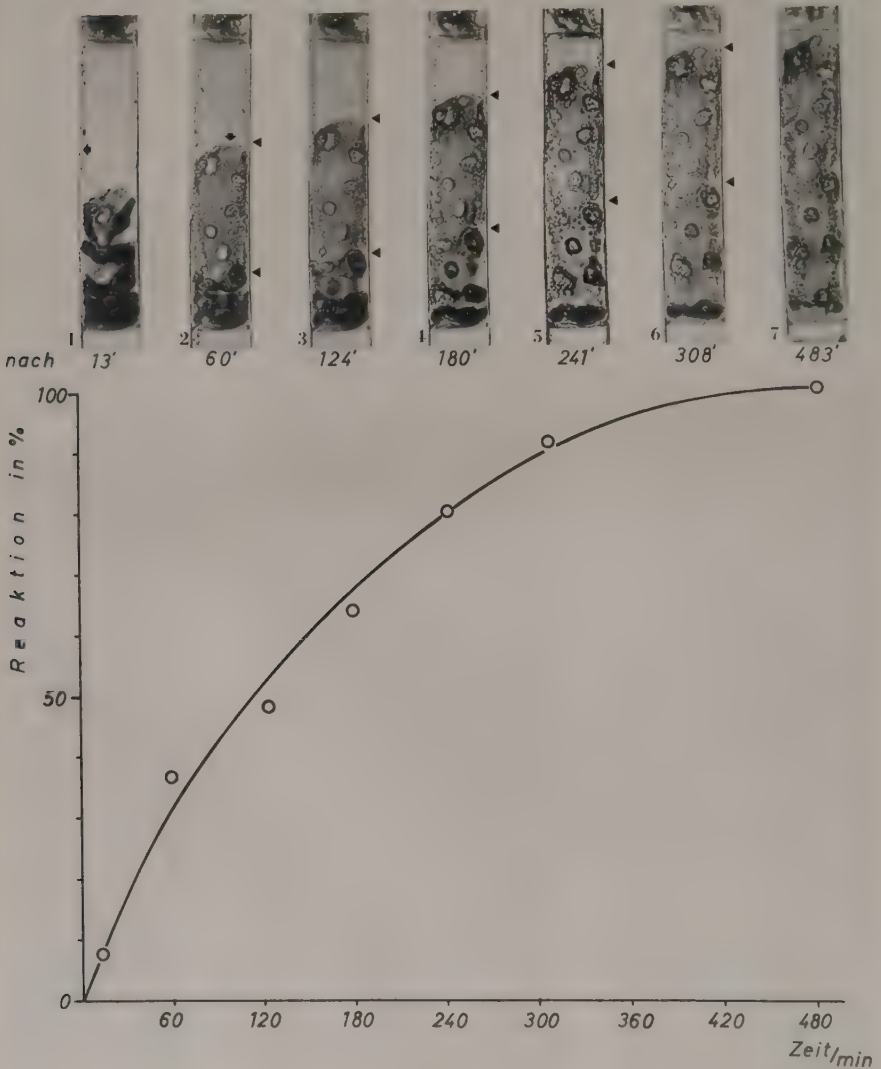


Abb. 15: Zeitlicher Verlauf der Chloroplastenrückverlagerung, dargestellt an einer Einzelzelle vom "Stamm Tübingen"

Abbildung 15 gibt den Reaktionsverlauf einer Einzelzelle anhand von Mikrophotographien wieder. Die 7 Stadien der Chloroplastenrückverlagerung zeigen dieselbe Zelle. Die sofort einsetzende Reaktion erkennt man an der Entfaltung des Chloroplasten. Während der Zentrifugation bleibt der cytoplasmatische Wandbelag unversehrt erhalten (schwarzer Pfeil, Stadium 1). Die Unversehrtheit des Cytoplasmawandbelages geht auch aus der Tatsache hervor, daß der Chloroplast zur lichtorientierten intrazellulären Bewegung, d.h. zur Drehung um seine ursprüngliche Längsachse, in dem aufgefalteten Zustand fähig ist. Sowohl die Fähigkeit zur Photoperception als auch die Elemente der Bewegungsmechanik blieben erhalten (vergl. auch SCHÖNBOHM 1971 a).

Stadium 1 zeigt den Zustand 13 Minuten nach Ende der Zentrifugation. Der Chloroplast ist während der Zentrifugation stark aufgefaltet worden; er nimmt dabei noch $56\text{ }\mu\text{m}$ seiner ursprünglichen Länge von $112\text{ }\mu\text{m}$ ein, das sind 50 %. Der Zentrifugationseffekt beträgt also $100 - 50 = 50\text{ }\%$. Der Kern hat die relative Lage zum Chloroplasten beibehalten. Er liegt nach wie vor auf der Mitte des Chloroplasten. Man erkennt ihn am Nukleolus, der in allen 7 Stadien durch einen offenen Pfeil gekennzeichnet ist. In Stadium 6 wurde die Schärfeebene auf die Oberfläche des in Schwachlichtstellung orientierten Chloroplasten gelegt. Die Kernregion ist an der ringförmigen Anordnung der Granula um die Plasmatasche zu erkennen.

Nach 60 Minuten (Stadium 2) hat sich ein Teil des Chloroplasten entfaltet. Der durch die Zentrifugation vom Chloroplasten befreite Teil der zylindrischen Zelle wird langsam wieder eingenommen. Der absolute Wert der zurückgelegten Strecke beträgt $16\text{ }\mu\text{m}$, das sind 36 % Reaktion. Der zentripetale Teil des Chloroplasten, bezogen auf die Zentrifugationsrichtung, hat sich entfaltet. Bemerkenswert ist die bis dahin unveränderte

Lage des Zellkerns. Er liegt noch auf gleicher Höhe und wurde von der Bewegung bisher nicht erfaßt, genauer gesagt: der unter dem Kern liegende Chloroplastenteil hat seine Lage relativ zur Zellwand noch nicht verändert. Diese Beobachtung besagt, daß in der Anfangsphase der Entfaltung keine passiven Entspannungen des gewaltsam aufgefalteten Plastiden wirksam sind. Diese müßten in dem am stärksten beanspruchten Teil des Chloroplasten am deutlichsten hervortreten; das ist eindeutig nicht der Fall. Die Unterschiede in der Schwärzung der Falten des Chloroplasten sind durch die Wiedergabetechnik bedingt.

Der Abstand vom "Vorderpol" des Chloroplasten (schwarzer Pfeil) zum Kern (offener Pfeil) bleibt im weiteren Verlauf der Reaktion konstant (vergl. die Markierungen rechts neben den Zellen). Beim Vergleich der Stadien 2 - 6 stellt man eine Parallelverschiebung dieses Bereiches fest. Die fortschreitende Reaktion besteht in der sukzessiven Entfaltung des "basalen" Chloroplastenteils. Dieses Geschehen läßt sich sehr gut an den Pyrenoiden "unterhalb" des Kernes verfolgen.

Nach 124 Minuten ist die Entfaltung um $9,4\mu\text{m}$ fortgeschritten, entspricht 48 % Reaktion, nach 180 Minuten um weitere $7,8\mu\text{m}$, entspricht 64 % Reaktion, nach 241 Minuten um $11\mu\text{m}$, entspricht 80 % Reaktion, nach 308 Minuten um weitere $4,5\mu\text{m}$, entspricht 91 % Reaktion. Nach 8 Stunden nimmt der Chloroplast die ursprüngliche Lage wieder ein. Ein Zipfel des Chloroplasten ist zurückgeschlagen (links oben), dieser Umstand könnte für die verzögerte Reaktion in der Endphase verantwortlich sein. Nach 6 Stunden kann die Chloroplastenentfaltung im allgemeinen als abgeschlossen angesehen werden. Es sind jedoch auch schnellere Rückverlagerungen möglich.

Die Reaktion des verlagerten Chloroplasten besteht also in einer kontinuierlichen Entfaltung. Zunächst erfolgt die Orientierungsbewegung des Chloroplasten; in dem

abgebildeten Beispiel wird die Schwachlichtstellung eingenommen. Es hat den Anschein, als ob der Chloroplast in den chloroplastenfreien Teil der Zelle hineingezogen würde.

Experimente zur Energetik der Chloroplastenstreckung

Theoretische Voraussetzungen

Aus der Abbildung 15 geht hervor, daß der Chloroplast für die Entfaltung 6 - 8 Stunden benötigt. In der Zeit wird eine Strecke von 56 μ m zurückgelegt. Es ist zu vermuten, daß die Reaktion äußerst wenig Energie pro Zeiteinheit verbraucht. Die lichtorientierte Chloroplastendrehung um seine Längsachse, sei es die Schwachlicht-, Starklicht- oder Induktionsbewegung wird jedem Fall einen größeren Energieumsatz pro Zeiteinheit erfordern. Eine kontinuierliche, minimale ATP-Produktion würde für die Chloroplastenrückverlagerung nach der Zentrifugation ausreichen.

Die geschilderte Reaktion ist ein aktiver intrazellulärer Vorgang. Aktive Bewegungen sind energieabhängig. Bei Blockierung der zelleigenen Energiequellen muß ein Reaktionsstillstand erwartet werden.

Der grünen Pflanzenzelle stehen folgende Quellen für den intrazellulären Energiehaushalt zur Verfügung:

1. die an den Elektronentransport der Photosynthese gekoppelten Phosphorylierungsreaktionen
2. die Substratkettenphosphorylierung (Glykolyse)
3. die oxydative Phosphorylierung
- und 4. im Experiment von außen zugegebenes ATP

- | | |
|-----------------------|--------------------|
| ATP aus Photo- | ATP aus der |
| 1. phosphorylierungs- | 2. Substratketten- |
| reaktionen | phosphorylierung |

R E A K T I O N

- | | |
|---------------------|----------------------|
| ATP aus der | exogenes ATP |
| 3. oxydativen Phos- | 4. aus dem Versuchs- |
| phorylierung | medium |

Abb. 16: Die ATP-liefernden Stoffwechselprozesse

Für die experimentelle Bearbeitung dieser Fragen kamen Versuche unter Sauerstoffausschluß, Hemmstoffversuche und Bestrahlungen mit unterschiedlichen Lichtqualitäten und -quantitäten zum Einsatz.

Die Reaktion im DD unter anaeroben Bedingungen

In Stickstoffatmosphäre und Dunkelheit sind sowohl die oxydative als auch die photosynthetischen Phosphorylierungsreaktionen unmöglich. Theoretisch könnte die Substratkettenphosphorylierung in geringem Umfang ATP produzieren. Doch müßte das eine Substratanhäufung zur Folge haben, die über den Weg der Rückkopplung die weitere glykolytische ATP-Bildung verhindert. Unter anaeroben Bedingungen in Dunkelheit kommt zunächst eine Reaktion in Gang (Abb. 17 Kurve A), jedoch nach ca. 2 Stunden kommt die Chloroplastenentfaltung zum Erliegen. Die erreichten Reaktionen liegen in der Regel zwischen 20 und 30 %, nur ausnahmsweise werden Werte über 30 % gemessen. Die Kurve C der Abbildung 17 unterscheidet sich von den Kurven A und B dadurch, daß eine etwas höhere Reaktion erreicht wird, diese aber schon früher, nach 80 Minuten, zum Erliegen kommt.

Reaktionsverlauf:

A) unter anaeroben Bedingungen im DD

B) unter anaeroben Bedingungen im DD und Luftzufuhr ab 180. Minute

C) unter anaeroben Bedingungen im DD und Weißlichtbestrahlung ab 140 Minute

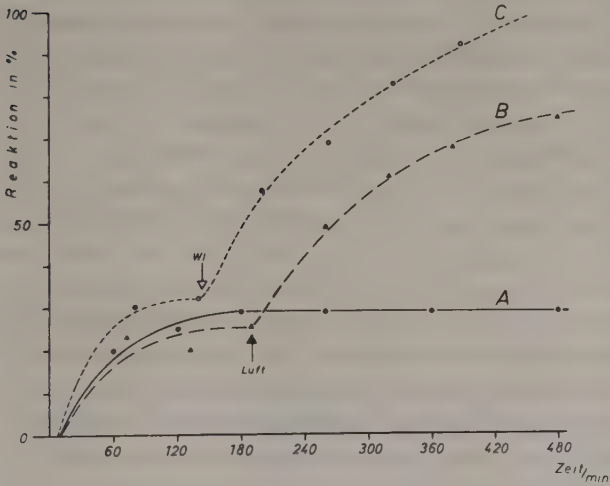


Abb. 17: Mougeotia "Stamm Erlangen"

Weißlichtintensität für Kurve C: 1400 Lux

nähere Erläuterungen im Text

Dieses Versuchsergebnis ist dadurch zu interpretieren, daß die Algen nach der Zentrifugation zunächst in sauerstoffgesättigte Nähr- bzw. Hemmstofflösung gebracht werden, die Versuchskammern verschlossen und

und dann erst der Stickstoffstrom eingeleitet wird. In den folgenden Minuten wird der in der Lösung gelöste Sauerstoff allmählich vom Stickstoff des Gasstromes in Abhängigkeit von den jeweils herrschenden Partialdrücken verdrängt. Damit steht den *Mougeotia*-Zellen noch Sauerstoff für eine gewisse Zeit zur Verfügung. Die Reaktion läuft unter Verbrauch des restlichen Sauerstoffs zunächst an.- Es ist auch daran zu denken, daß der ATP-pool der Zelle die Reaktion in der Anfangsphase versorgt.- Theoretisch kann nicht ausgeschlossen werden, daß zunächst eine glykolytische ATP-Produktion einsetzt, die erst durch eine Substratanhäufung zum Erliegen kommt. Da im Zustand der andauernden Anaerobiose kein ATP synthetisiert wird, kommt es zum absoluten Stillstand der Reaktion. Versuche, die Reaktion durch ATP-Zugabe in Gang zu bringen, verliefen negativ. SCHÖNBOHM (1969a) konnte zeigen, daß die Mougeotia-Zelle ATP aufnehmen kann. Die ATP-Aufnahme ist offenbar selbst ein energieabhängiger Vorgang, denn alle Experimente SCHÖNBOHM's, die die ATP-Aufnahme bestätigen, wurden unter aeroben Versuchsbedingungen durchgeführt. Wenn man den absoluten Reaktionsstillstand durch die Blockierung aller energieliefernden zelleigenen Stoffwechselprozesse interpretiert und unter denselben Bedingungen keine ATP-Aufnahme erfolgt, dann muß die ATP-Aufnahme ein energieverbrauchender Membrantransport sein.

Die Reaktion unter Luftzufuhr nach längerer Anaerobiose in Dunkelheit

Die oxydative Phosphorylierung kann die Energie bereitstellen; das geht aus den Ergebnissen, die durch die Kurve B der Abbildung 17 dargestellt sind, hervor. Wird nach ca. 3 stündiger Anaerobiose, die Reaktion

ist zu diesem Zeitpunkt längst zum Erliegen gekommen, der Stickstoffstrom durch einen Luftstrom ersetzt, so setzt daraufhin die Reaktion wieder ein.

Der näheren Untersuchung des Einflusses der oxydativen Phosphorylierung auf die Chloroplastenentfaltung waren Grenzen gesetzt dadurch, daß einige Entkoppler und Hemmstoffe der Atmungskette in diesem Langzeitversuch nicht erfolgreich eingesetzt werden konnten. DNP (Dinitrophenol) führte nach 1,5 bis 2 Stunden Einwirkungsdauer zum Absterben der Zellen, wie es auch durch Atebrin geschah. Lediglich Natriumazid, NaN_3 , bewirkte eine Reaktionshemmung (SCHLÜTER und SCHÖNBOHM, 1974) im DD durch eine 10^{-3} und 10^{-4} n Konzentration an der Luft. Im Weißlicht 6500 Lux haben diese NaN_3 -Konzentrationen keinen Einfluß auf die Chloroplastenstreckung; darin zeigt sich eine bevorzugte Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung gegenüber der Photophosphorylierung durch NaN_3 .

Überraschenderweise bewirkte KCN keine Hemmung. Dieses ist insofern erstaunlich, da das Cyanid-ion als potenter Komplexbildner eisenhaltiger Enzyme angesehen wird, es also die Atmung vergiften sollte. SCHÖNBOHM (1970) konnte mit diesem Hemmstoff den Nachweis erbringen, daß die Induktionsbewegung des Mougeotia-Chloroplasten, die durch einen Lichtstoß induziert wird, aber in Dunkelheit abläuft, durch 10^{-4} n KCN stark gehemmt wird. Das Ausbleiben jeglicher Hemmung durch KCN kann dadurch interpretiert werden, daß die zur Erreichung des Reaktionsstillstandes erforderliche vollständige Hemmung der Atmung im Langzeitversuch nicht erreicht wird. Denn es sprechen Tatsachen für einen minimalen Energiebedarf der Chloroplastenentfaltung, wie der langsame, kontinuierliche Ablauf der Streckung und die Lichtsättigung bei niedrigen Intensitäten (s. S.50). Die Möglichkeit einer verminderten KCN-Wirksamkeit kann auch in der Reaktion des Cyanid-ions mit anderen Kationen als den Fe-Zentralatomen der Enzymmoleküle gesehen

werden. Die ENS-Lösung enthält Eisenionen in nicht bekannter Konzentration, wie auch die MXS-Lösung Eisenionen enthält. Bezieht man die schwankenden Enzymaktivitäten der Zellen mit in die Überlegungen ein, so kann unter der Berücksichtigung aller angeführten Fakten eine hinreichende Erklärung für die fehlende KCN-Hemmung gesehen werden.

Die Reaktion im Weißlicht unter anaeroben Bedingungen nach längerer Dunkelphase

Als letzte Möglichkeit ist die ATP-Bildung während der Photosynthese zu prüfen. Die Algen bleiben im Stickstoffstrom und werden nach 140 Minuten, die Chloroplasten strecken sich seit 1 Stunde nicht mehr, mit Weißlicht 1400 Lux bestrahlt. Wie das durch die Kurve C in Abbildung 17 wiedergegeben Ergebnis zeigt, setzt die Chloroplastenstreckung sofort wieder ein.

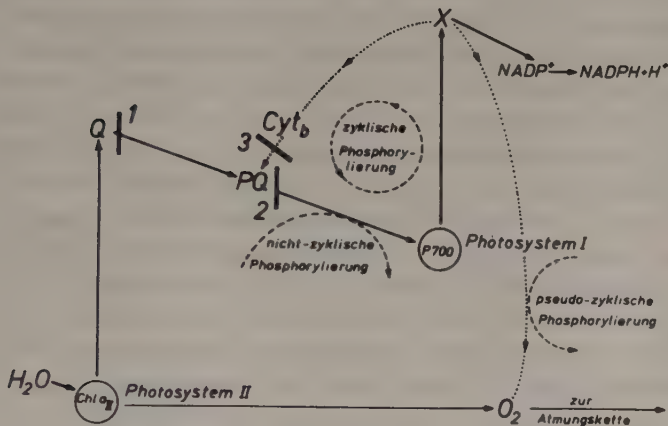
Diese Versuche haben gezeigt, daß sowohl die Atmung als auch die Photosynthese die erforderliche Energie bereitstellen kann.

Experimente zum Einfluß der Photosynthese

Theoretische Grundlagen

Bevor über die weiteren Ergebnisse berichtet wird, sollen anhand einer Schemazeichnung die verschiedenen Möglichkeiten der experimentellen Eingriffe in das photosynthetische Reaktionsgeschehen erläutert werden. Dem Schema liegt das allgemein anerkannte HILL-BENDALL-Modell zugrunde. Die Angriffsstellen der benutzten Hemmstoffe sind eingezeichnet. Es sind nur die Glieder der Elektronentransportkette berücksichtigt, die für die Interpretation der Ergebnisse von Bedeutung

sind; das Schema ist also stark vereinfacht.



Angriffsstellen der Hemmstoffe: 1 DCMU
2 DBMIB
3 Antimycin A

Abb. 18: Stark vereinfachtes Schema zur Erläuterung des photosynthetischen Reaktionsgeschehens

Durch Weißlicht werden beide Photosysteme angeregt. Die aus der Wasserspaltung stammenden Elektronen gelangen über mehrere Redoxträger in Serienschaltung zum Endakzeptor $NADP^+$, der unter gleichzeitiger Aufnahme von Protonen reduziert wird. In der Dunkelreaktion kann der im $NADPH+H^+$ vorübergehend festgelegte Wasserstoff zur CO_2 -Fixierung in den enzymatischen Reaktionen des Calvin-Cyclus abgegeben werden. Während die Lichtreaktionen im Thylakoidsystem des Chloroplasten ablaufen, findet die enzymatische CO_2 -Reduktion in der Chloroplastenmatrix statt. Als Transportmetabolite durch die Chloroplastenmembran werden die C_3 -Moleküle

Dihydroxy-aceton-phosphat und Glycerin-aldehyd-3-phosphat angenommen (HELDT und SAUER 1971, HELDT et al. 1972, HEBER 1974, HEBER und KIRK 1975).

Bei kontinuierlich arbeitender Elektronentransportkette muß ein Elektronenakzeptor in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Wenn das nicht der Fall ist, muß mit einer Störung im Ablauf der photosynthetischen Lichtreaktionen gerechnet werden.

Mit dem nicht-zyklischen Elektronentransport durch beide Photosysteme zum terminalen Akzeptor NADP^+ ist die nicht-zyklische Phosphorylierung verbunden. Für die zu untersuchende Reaktion und für die Interpretation der Ergebnisse ist weder die genaue Stelle des Phosphorylierungsvorgangs, der Synthese von ATP aus ADP und anorganischem P_i , noch die absolute ATP-Bildungsrate pro transportiertes Elektronenpaar von Bedeutung. Im Schema wurde die Phosphorylierungsstelle "hinter" das Plastochinon PQ gelegt, der überwiegenden Mehrzahl der Literaturvorschläge folgend (siehe dazu GOOD and IZAWA 1973, TREBST und HAUSKA 1974).

In den letzten Jahren mehren sich die Befunde für den Ablauf einer pseudo-zyklischen Phosphorylierung in vivo. Diese Phosphorylierungsreaktion ist an einen pseudo-zyklischen Elektronentransportweg gebunden. Dieser soll dann beschrieben werden, wenn Sauerstoff aus der Wasserspaltung als Elektronenakzeptor mit den Elektronenakzeptoren auf der reduzierenden Seite von Photosystem I um die Elektronen in Konkurrenz tritt. Damit werden die Elektronen wieder vom Sauerstoff aufgenommen, von dem sie formal durch Photosystem II getrennt worden waren. Die Elektronen haben also einen pseudo-zyklischen Reaktionsweg durchlaufen (s. Abb.18).

Als dritte Phosphorylierungsreaktion der Photosynthese muß die zyklische Phosphorylierung genannt werden. Über ihren Ablauf in vivo bestehen keine Zweifel

(TANNER et al. 1965, SYRETT 1966, SIMONIS 1967, ULLRICH und SIMONIS 1969, GIMMLER und AVRON 1972, ULLRICH 1971, URBACH und KAISER 1972, BEDELL und GOVINDJEE 1973).

Die geläufige Interpretation der zyklischen Photophosphorylierung ist folgende: Vom Licht angeregte Elektronen des P 700 dienen zur Reduktion eines Akzeptors, dessen Natur nach wie vor umstritten ist; dann transportiert eine Reihe von Elektronenüberträgern, dem elektrochemischen Gradienten folgend, die Elektronen zurück zur oxydierenden Seite von Photosystem I. Mit diesem Elektronentransport ist eine ATP-Bildung gekoppelt. Demnach kann die zyklische Phosphorylierung experimentell von jeder anderen Art chloroplastidärer Phosphorylierung durch 2 Kriterien unterschieden werden:

1. durch die Resistenz gegenüber Hemmstoffen des Photosystems II, z.B. DCMU
2. durch die Tatsache, daß im dunkelroten Bereich absorbiertes Licht von Photosystem I durch P 700 die Anregung der Reaktion gewährleistet.

Die Wirkung der benutzten Hemmstoffe

D C M U 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylharnstoff

Dieser Hemmstoff blockiert den nicht-zyklischen Elektronentransport. In vivo wird die Sauerstoffproduktion durch DCMU-Konzentrationen von $5 \times 10^{-7} \text{ m}$ (URBACH und GIMMLER 1970, GIMMLER et al. 1971) bis 10^{-5} m (ULLRICH 1971) vollständig blockiert. Diese Konzentrationsunterschiede können von der unterschiedlichen Strahlungsintensität und von den benutzten Objekten abhängen. DCMU wird von verschiedenen Objekten in unterschiedlichem Maße aufgenommen (FRICKEL-FAULSTICH 1974). Darüber hinaus kann die Hemmwirkung von DCMU vom Entwicklungszustand der Zellen abhängig sein (GIMMLER et al. 1971). Dagegen soll der zyklische Elektronen-

transport um Photosystem I nicht beeinflußt werden oder erst durch höhere Konzentrationen (GOOD and IZAWA 1973, BORNEFELD und SIMONIS 1974).

Das bedeutet für den Fall der Chloroplastenentfaltung, daß mit der vollständigen Blockierung von Photosystem II durch DCMU kein Sauerstoff entsteht, der in zwei verschiedenen Reaktionssystemen als Elektronenakzeptor fungieren könnte: 1. in der pseudo-zyklischen Phosphorylierung und 2. als Endakzeptor der Atmungskette (s. Abb. 18). Bei Einstrahlung von Weißlicht werden beide Photosysteme angeregt; dasselbe gilt für die Einstrahlung von Hellrot (Wellenlängen < 700 nm). Die Hemmstelle wurde auf der reduzierenden Seite von Photosystem II eingezeichnet, auch wenn der Eingriff im Reaktionszentrum von Photosystem II nicht ausgeschlossen ist, so stellt das für die Auswertung der Ergebnisse keinen Unterschied dar.

D B M I B 2,5-dibrom-3-methyl-6-isopropyl-p-benzochinon

DBMIB greift in der Elektronentransportkette zwischen beiden Photosystemen ein. Allgemein wird seine Wirkung als Antagonist zum Plastochinon angenommen. Es soll die enzymatische Reoxydation von reduziertem Plastochinon verhindern. Dieser von BÖHME et al. (1970) vorgeschlagene Mechanismus der Hemmwirkung wurde in zahlreichen Publikationen bestätigt (z.B. KOUCHKOWSKY 1974). DBMIB hemmt in einer Konzentration von 4×10^{-7} M die Sauerstoffentwicklung in vivo zu 50 % (GIMMLER und AVRON 1972). Die in-vivo-Experimente mit Porphyridium von GIMMLER und AVRON unterstützen den Vorschlag (TREBST et al. 1970, BÖHME et al. 1971), daß DBMIB seinen Hemmeffekt im Elektronentransportsystem zwischen Plastochinon und Cytochrom f ausübt. Nimmt man die Einmündungsstelle des zyklischen Elektronenflusses zwischen Photosystem II und I in der Nähe des Plastochinons an, dann muß DBMIB auch den zyklischen Elektronenweg blockieren. URBACH und KAISER (1972) bestä-

tigen diese Vermutung durch in-vivo-Experimente mit Ankistrodesmus braunii. Diese Autoren konnten nachweisen, daß DBMIB auf die oxidative Phosphorylierung keinen Einfluß hat, was für die Untersuchung der Chloroplastenrückverlagerung von großer Bedeutung ist.

A N T I M Y C I N A

Antimycin A gilt als relativ spezifischer Hemmstoff der zyklischen Phosphorylierung und der oxidativen Phosphorylierung. In zahlreichen in-vivo-Experimenten hat sich dieser Hemmstoff zur Untersuchung der zyklischen Phosphorylierung bewährt. (URBACH und SIMONIS 1964, TANNER et al. 1966, ULLRICH und SIMONIS 1969, ULLRICH 1971). Da in den folgenden Experimenten die oxidative Phosphorylierung durch Schaffung einer sauerstofffreien Atmosphäre ausgeschaltet werden kann, ist es möglich, diesen Hemmstoff gezielt einzusetzen.

Der Einsatz von Hemmstoffen ist nur unter definierten Bedingungen sinnvoll. Deshalb muß zunächst die Frage beantwortet werden, wie die Chloroplastenstreckung bei Einstrahlung unterschiedlicher Weißlichtintensitäten verläuft. Welche Intensitäten sind zur Lichtsättigung ausreichend ?

Außerdem erscheint es notwendig, dem CO_2 -Einfluß nachzugehen.

Weißlichtsättigung der Chloroplastenrückverlagerung unter anaeroben Bedingungen

Durch die Einstrahlung von Weißlicht konnte die Reaktion wieder in Gang gebracht werden (s. Abb. 17 Kurve C). Der Anstieg im Kurvenverlauf ähnelt dem der Abbildung 15. Deshalb stellt sich einmal die Frage nach der Lichtsättigung der Reaktion und zum anderen muß geklärt werden, ob durch ein erhöhtes ATP-Angebot aus Photo-

synthese u n d Atmung eine Reaktionsbeschleunigung erreicht werden kann. Abbildung 19 stellt die Ergebnisse entsprechender Versuche dar.

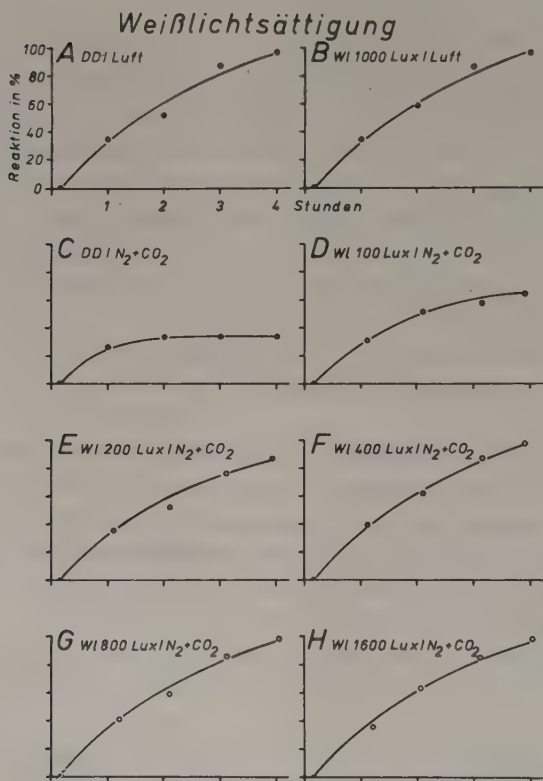


Abb. 19: Weißlichtsättigung; "Stamm Tübingen"
Erläuterungen im Text

Die Algen zeigen im Luftstrom in Dunkelheit wie im Weißlicht 1000 Lux völlig identischen Reaktionsverlauf (vergl. Diagramme A und B der Abb. 19). Ein Summations-effekt aus Atmungs- und Photophosphorylierungsenergie

tritt n i c h t ein. Weder ein erhöhtes Energieangebot noch die unterschiedliche Herkunft des ATP's hat einen Einfluß auf den zeitlichen Verlauf der Reaktion. Daraus ist zu schließen, daß für die energetische Seite der Reaktion unter diesen Bedingungen Sättigung vorliegt. Dieser Schluß wird durch Ergebnisse, die durch die Diagramme C - H dargestellt sind, abgesichert. Die Diagramme C - H der Abbildung 19 zeigen die Reaktion auf die Einstrahlung steigender Weißlichtintensitäten. Der Kurvenverlauf im Diagramm C ist dem der Verlauf der Kurve A der Abbildung 17 S.41 vergleichbar. Nachdem die Reaktion 30 % erreicht hat, kommt die Chloroplastenentfaltung zum Erliegen. Dagegen nimmt die Reaktion mit steigender Intensität zu und erreicht bei der Einstrahlung von 400 Lux bereits die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (Diagramm F). Auffallend ist neben dieser recht niedrigen Strahlungsintensität die relativ hohe Reaktion unter 100 Lux, nach 4 Stunden haben sich die Chloroplasten zu 64 % entfaltet (Diagramm D). Höhere Weißlichtintensitäten als die der Sättigung von 400 Lux führen zu keiner weiteren Beschleunigung der Reaktion (Diagramme G und H). Werden 20000 Lux eingestrahlt, so nehmen die Chloroplasten in der Anfangsphase der Rückverlagerung Kantenstellung ein. Eine Überlagerung der lichtorientierten Bewegung mit der Entfaltungsbewegung führt zu keiner veränderten Kinetik.

Es soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß die Chloroplastenstreckung schon nach 4 Stunden beendet ist. Erinnern wir uns an die anhand von Abbildung 15 auf S. 36 geschilderte Reaktion, so müssen wir feststellen, daß dort die Reaktion bedeutend langsamer abläuft. Ein Vergleich der Reaktionswerte nach 3 Stunden ergibt eine Differenz von 21 %. Da es sich in beiden Fällen um Versuchsmaterial des "Stammes Tübingen" handelt, erscheint es angebracht, diesem Problem der

variiierenden Reaktionsgeschwindigkeiten noch einmal nachzugehen.

Der Einfluß von CO_2 auf die Chloroplastenrückverlagerung

Der überwiegende Teil der Versuche wurde bisher in reiner Stickstoffatmosphäre durchgeführt, und Reaktionen der geschilderten Art durch Weißlichtbestrahlung gemessen. Doch war der Reaktionsverlauf nicht immer konstant, was die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erschwerte. Die Beimischung von CO_2 -Spuren zum Stickstoffstrom konnte die Abweichungen egalisieren. Es stellte sich heraus, daß sich unterschiedliche CO_2 -Effekte für einzelne Anzuchtschalen entwickelt hatten. Es waren niemals breite Streuungen der Reaktionswerte im Material einer Kulturschale festzustellen; entweder konnte die Chloroplastenverlagerung in reiner Stickstoff-Atmosphäre nahezu unverzüglich erfolgen, oder es kam im Extremfall zum Stillstand. Einen solchen Fall^{zeigt} die Abbildung 20. Die Kulturschalen Tü 29 und Tü 30 enthielten von der Anzucht her gleiches Versuchsmaterial. An mehreren aufeinanderfolgenden Tagen zeigten sich aber für diese Schalen deutliche Reaktionsunterschiede. In Dunkelheit unter Luftzutritt reagierten beide vollkommen gleich (vergl. die Kurven 1 und 2 der Abb. 20). Die oxidative Phosphorylierung liefert die erforderliche Energie. Bei Weißlichteinstrahlung im reinen Stickstoffstrom zeigten sich dagegen deutliche Unterschiede: Die Algen aus der Kulturschale 29 reagierten gut und erreichten unter 600 Lux Weißlicht nach ca. 5,5 Stunden eine Reaktion von 60 % (Diagramm 3). Demgegenüber kam die Reaktion bei den Algen aus der Anzuchtschale Tü 30 zum Stillstand. (Diagramm 4). Eine Erhöhung der Weißlichtintensität um den Faktor 10 bewirkt im Fall der Schale Tü 29 eine Reaktionssteigerung auf 86 %, im Fall der Schale Tü 30 kann dadurch keine

Reaktion erreicht werden, es bleibt beim Stillstand (Diagramm 6). Wurde dem Stickstoffstrom CO_2 beigemischt (die Konzentration wurde nicht genau gemessen, lag aber deutlich unter 1 %), so trat in beiden Fällen optimale Reaktion ein. Vergleicht man die Diagramme 3 mit 7 und

Unterschiedliche Reaktion in N_2 -Atmosphäre

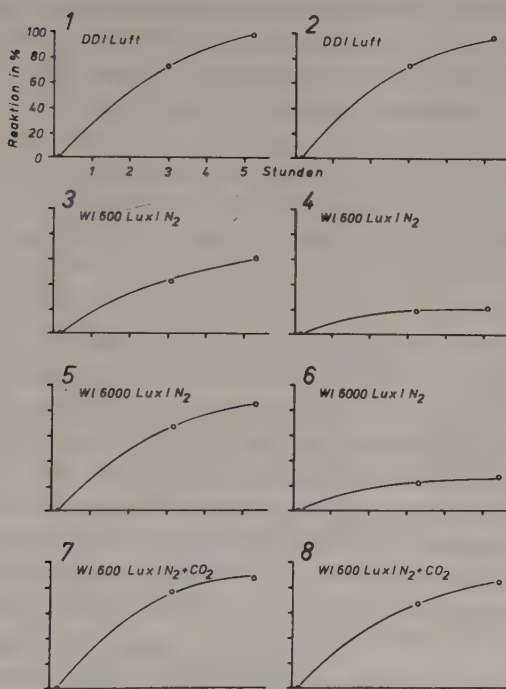


Abb. 20: Unterschiedliche Reaktion in Stickstoffatmosphäre
Diagramme 1, 3, 5, 7 Anzuchtschale Tü 29
Diagramme 2, 4, 6, 8 Anzuchtschale Tü 30
weitere Erläuterungen im Text

4 mit 8 so stellt man fest, daß im ersten Fall die Reaktion erhöht wird von 60 auf 86 % und im zweiten Fall vom Reaktionsstillstand (21 %) auf 85 %.

Dieser Befund zeigt, daß beide Kulturen in der Reaktionsfähigkeit vom CO_2 -Anteil des Gasstromes abhängig sind. Diese Abhängigkeit ist für den Reaktionsverlauf der Kulturschale Tü 30 absolut, d.h. ohne CO_2 kommt die Reaktion rasch zum Stillstand. Mit CO_2 erreicht sie die volle Reaktion von 85 %; demgegenüber ist das Versuchsmaterial aus der Anzuchtschale Tü 29 weniger stark vom CO_2 -Gehalt im Stickstoff abhängig. Hier kam es zu einer Beschleunigung der Reaktion von 60 auf 86 %. Es genügen also offenbar Spuren von CO_2 , denn eine Erhöhung der CO_2 -Konzentration von unter 1 % auf über 5 % führt bei dem CO_2 -abhängigen Algen zu keiner weiteren Steigerung der Reaktion.- Die Algen in den beiden Anzuchtschalen wiesen im mikroskopischen Bild keine Unterschiede auf, weder in der Farbe noch in der Wuchsform.

Diese Ergebnisse waren Anlaß dazu, in Zukunft die Algen nicht mehr mit reiner N_2 -Atmosphäre zu begasen, sondern mit einem N_2 - CO_2 -Gemisch.

Eine gängige Interpretation der CO_2 -Wirkung auf die Lichtreaktionen der Photosynthese ist die, daß in Anwesenheit von CO_2 die Elektronen den nicht-zyklischen Elektronentransportweg durchlaufen und in CO_2 -Abwesenheit die Aktivierung des zyklischen Elektronentransportes erfolgen soll. (GIMMLER et al. 1971, BEDELL and GOVINDJEE 1973). Grünalgen wie Chlorella und Ankistrodesmus können aber auch unter anaeroben Bedingungen und CO_2 -Abwesenheit im Licht durchaus noch Sauerstoff freisetzen (ULLRICH 1971), was für einen nicht-zyklischen Elektronentransport spricht. Die Funktion des CO_2 als Elektronenakzeptor kann von anderen reduzierbaren Molekülen übernommen werden, z.B. durch NO_3^- .

Vor einer allzu schematischen Betrachtungsweise

der Lichtreaktionen der Photosynthese und ihrer Beziehungen sowohl untereinander als auch zu den nachfolgenden Dunkelreaktionen muß deshalb gewarnt werden. Das HILL-BENDALL-Modell berücksichtigt im wesentlichen die relative Zuordnung der verschiedenen Elektronenüberträger auf der Basis ihrer Redoxpotentiale. Die ständigen Abwandlungen dieses Modell in den vergangenen Jahren erfahren hat und bestimmt in Zukunft erfahren wird, bestätigen die Unvollkommenheit, obwohl es zur Veranschaulichung mancher Befunde sehr nützlich sein kann.

Versuche mit D C M U

DCMU, ein Hemmstoff des nicht-zyklischen Elektronentransportes, bewirkt eine konzentrationsabhängige Hemmung trotz sättigender Weißlichteinstrahlung. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.

Plastidenrückverlagerung im N_2 - CO_2 -Strom

Wirkung von DCMU unterschiedlicher Konzentration bei Weißlichtbestrahlung

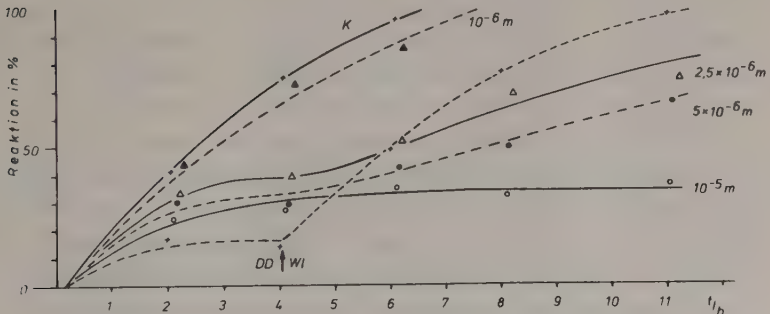


Abb. 21: Konzentrationsabhängige Wirkung von DCMU unter sättigender Weißlichteinstrahlung 1000 Lux

Bei 10^{-5} M DCMU-Konzentration kommt die Reaktion bei 33 % zum Stillstand, wogegen die Kontrolle (Kurve K) nach 6 Stunden zur vollen Chloroplastenentfaltung geführt hat. Nach ca. 3 - 4 Stunden wirkt sich der volle Hemmeffekt im 10^{-5} M-Präparat aus. Algen derselben Anzuchtchale zeigen im DD einen früheren Reaktionsstillstand (untere, gestrichelte Kurve), nämlich bei 15 %. Die Erklärung muß in dem Mechanismus der Hemmwirkung von DCMU gesucht werden. DCMU soll sehr schnell in die Zellen eindringen und schon im Minutenbereich die Photosynthese, d.h. die mit dem nicht-zyklischen Elektronentransport verbundene Sauerstoffentwicklung, vollständig blockieren (GOULD and BASSHAM 1965). Die Differenz zur Reaktion im DD (18 %) kann damit erklärt werden, daß die vollständige Hemmung durch DCMU nicht so schnell erfolgt. Es ist an Permeationsschwierigkeiten des Hemmstoffes durch die verschiedenen Membranen zu denken.

Nach in-vivo-Experimenten wird von der Mehrzahl der Autoren angenommen, daß DCMU-Konzentrationen die zyklische Phosphorylierung gar nicht oder nur geringfügig beeinflussen. BORNEFELD und SIMONIS (1974) fanden keine Abnahme des ATP-pools von Anacystis nidulans durch eine DCMU-Konzentration von 5×10^{-6} M.-

TANNER et al. (1965) konnten zwar durch steigende DCMU-Konzentrationen die anaerobe Assimilation von Glukose durch Chlorella-Zellen zunehmend hemmen, doch stellte sich im DCMU-Konzentrationsbereich von 5×10^{-6} M bis 5×10^{-5} M ein Plateau der Hemmwirkung bei 80 % ein. Dieses Ergebnis wird als gleichbleibende Aktivität der zyklischen Phosphorylierung interpretiert.-

URBACH und KAISER (1972) fanden unter Einwirkung von 10^{-5} M DCMU nur eine teilweise Hemmung der ATP-Synthese durch Ankistrodesmus braunii. Sie konnten beweisen, daß die ATP-Synthese unterdiesen Bedingungen der zyklischen Phosphorylierung zuzuschreiben ist.

Durch Weißlichtversuche allein ist hier eine Klärung über die Beteiligung der zyklischen Phosphorylierung in DCMU-Präparaten an der Chloroplastenrückverlagerung nicht möglich. Experimente mit Hellrot und Dunkelrot unter Einsatz von DCMU, sowie Versuchen mit Antimycin A und DBMIB sind angebracht.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse polarographischer Sauerstoffmessungen zusammengestellt.

Tabelle 1: Sauerstoffentwicklung bei quantengleicher Einstrahlung von Hellrot und Dunkelrot;
52 kerg/cm².sec bezogen auf 664 nm; Messung bei 28 °C.
Die Sauerstoffentwicklung der Kontrolle im HR wurde gleich 100 gesetzt.

	HR	DR
in MXS	100	27
DCMU 10 ⁻⁵ m	2,0	2,0
DCMU 5 x 10 ⁻⁶ m	1,4	0,4
DCMU 2,5 x 10 ⁻⁶ m	4,5	2,6
DCMU 10 ⁻⁶ m	11,2	4,1

Es überrascht, daß im Dunkelrot 723 nm eine erhebliche Sauerstoffentwicklung meßbar ist, sie beläuft sich auf 27 % derjenigen im Hellrot. Die allgemeine Auffassung, durch Wellenlängen > 700 nm werde ausschließ-lich Photosystem I angeregt, kann in diesem Fall nicht aufrechterhalten werden. In ungehemmten Kontrollpräparaten findet im dunkelroten Spektralbereich eine merkliche Sauerstoffentwicklung statt, die aus der Anregung von Photosystem II stammen muß. Die Halbwertsbreite des benutzten Interferenzfilters beträgt 19 nm, die Durchlässigkeit für Wellenlängen < 700 nm ist gleich null.- Die für 10⁻⁵m und 5 x 10⁻⁶m angegebenen Werte sind gleich null zu setzen. Die Schwankungen um die Größenordnung von 2 - 3 relativen Einheiten sind metho-

disch bedingt. Im Hellrot ist erst eine geringe O_2 -Produktion bei der DCMU-Konzentration von $2,5 \times 10^{-6} m$ nachzuweisen, es wurden 4,5 relative Einheiten gemessen. Eine annähernd gleiche O_2 -Entwicklung läuft im Dunkelrot, wenn $10^{-6} m$ DCMU einwirkt. Bei dieser DCMU-Konzentration kann im Hellrot eine Sauerstoffentwicklung gemessen werden, die 11 % der MXS-Probe entspricht.

Bevor die DCMU-Wirkung im Weißlicht, die Ergebnisse der Abbildung 21, erklärt werden kann, sind Versuche im Hellrot 664 nm und Dunkelrot 723 nm unter verschiedenen DCMU-Konzentrationen durchzuführen. Daraus sind Abschätzungen der Wirksamkeiten der beiden Photosysteme möglich.

Die Ergebnisse vergleichbarer Versuchsserien sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Wie bei allen Serien sind parallel Kontrollpräparate ausgewertet worden.

Tabelle 2: Wirkung von DCMU auf die Chloroplastenrückverlagerung im Weißlicht 2100 Lux, Hellrot 1000 erg/cm².sec und Dunkelrot 7000 erg/cm².sec

Serie		Reaktion in % MXS-Präparate		Reaktion in % DCMU-Präparate	
		nach 120	240 min	nach 120	240 min
1	Weißlicht	65	96	26	32
	DCMU	85	100	32	43
	5×10^{-6} Dunkelrot	85	100	22	22
2	Weißlicht	45	82	25	43
	DCMU	73	100	21	36
	$2,5 \times 10^{-6}$ Dunkelrot	70	100	10	10
3	Weißlicht	49	87	38	80
	DCMU	84	100	69	90
	10^{-6} Dunkelrot	80	100	49	73

DCMU $10^{-5} m$: Im Weißlicht (vergl. Abb. 21) kommt die Chloroplastenstreckung zum Erliegen, was durch die Werte von 26 % nach 2 Stunden und 32 % nach 4 Stunden ange-

Tabelle 1: polarographisch ist keine Sauerstoffentwicklung nachzuweisen.

DCMU 5×10^{-6} m: Im Weißlicht wird eine sehr stark verlangsamte, aber kontinuierlich ablaufende Reaktion registriert (Abb. 21 und Tab. 2 Serie 1 DCMU-Präparat). Aus Tabelle 2 ist eine Reaktionszunahme um 6 % im Zeitraum zwischen 120 und 240 Minuten zu entnehmen. Dieser Wert stimmt mit dem der entsprechenden Kurve der Abb. 21 vergleichend überein. Polarographisch ist keine Sauerstoffentwicklung festzustellen. Damit wird die Beteiligung der zyklischen Phosphorylierung wahrscheinlich gemacht. Doch widerspricht dem, daß im Dunkelrot die Reaktion keine Zunahme zeigt (Tab. 2). Nach 2 Stunden beträgt die Reaktion 22 %, die sich im Verlauf der nächsten 2 Stunden nicht erhöht. Eine Beteiligung der zyklischen Phosphorylierung ist unter diesen Bedingungen ausgeschlossen. Die Reaktionszunahme um 11 % im Hellrot (von 32 auf 43 %) spricht für eine Anregung von Photosystem II und den damit verbundenen nicht-zyklischen Elektronentransport.

Diese Befunde zwingen zu einer kritischen Betrachtung der Methoden. Mit der Clark-Elektrode werden Veränderungen der Sauerstoffkonzentrationen in der Nährlösung gemessen. Sauerstoffanreicherungen, resultierend aus der photosynthetischen Wasserspaltung, werden erst dann registriert, wenn i n t r a z e l l u l ä r eine Sauerstoffübersättigung eintritt. Diese Methode gibt keinen Aufschluß über die Beteiligung von Photosystem II bei der Chloroplastenrückverlagerung. In Anwesenheit von 5×10^{-6} m DCMU ist die O_2 -Entwicklung im Chloroplasten nicht so stark, daß eine Sauerstoffanreicherung außerhalb der Zelle registriert wird. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß sehr geringe Mengen Sauerstoff gebildet werden, diese die Zelle nicht verlassen, da in der Zelle ohnehin Sauerstoffmangel besteht. Damit könnte der Sauerstoff in der bereits erwähnten Weise als

Elektronenakzeptor der pseudo-zyklischen Elektronenträgerkette fungieren oder in den Mitochondrien als Endakzeptor der Atmungskette dienen. Die Ergebnisse von ULLRICH (1971) unterstützen diese Deutung. Mittels Fluoreszenzmessungen konnte er bei 5×10^{-6} M DCMU noch einen deutlichen Elektronenfluß feststellen, der erst durch 10^{-5} M DCMU vollständig unterdrückt wurde. Damit wäre auch die totale Reaktionshemmung, wie sie Weißlicht beobachtet wird (Abb. 21) erklärbar.

DCMU $2,5 \times 10^{-6}$ M: Unter Weißlichteinstrahlung bewirkt diese Konzentration eine Hemmung, die der unter 5×10^{-6} M prinzipiell ähnlich ist. Im Dunkelrot kann keine Reaktion festgestellt werden, sie kommt nach Erreichen des Wertes von 10 % zum Stillstand (Tabelle 2, Serie 2). Eine Sauerstoffentwicklung kann polarographisch nicht nachgewiesen werden. Im Weißlicht wie im Hellrot finden stark verzögerte Reaktionen, die jedoch kontinuierlich ablaufen, statt. Das Ausmaß der Reaktion ist erwartungsgemäß höher. Im Weißlicht steigt sie in der 3. und 4. Stunde um 18 %, von 25 auf 43 % und im Hellrot um 15 %, von 21 auf 36 % (Tab. 2). Dieses ist als zunehmende Aufhebung der Hemmung von Photosystem II zu erklären. Dafür und für die obigen Bemerkungen zur Methode der Sauerstoffmessung spricht auch die Tatsache, daß im Hellrot eine Sauerstoffanreicherung im Medium stattfindet. Mit abnehmender Hemmung wird eine Aktivität von Photosystem II zugelassen, die eine positive O_2 -Bilanz zur Folge hat. Dieser positiven Sauerstoffbilanz entspricht jedoch keine sprunghafte Reaktionssteigerung. Die nicht-zyklische Elektronentransportkette scheint aber noch gehemmt zu sein.

DCMU 10^{-6} M: Im Weißlicht (Abb. 21 und Tab. 2 Serie 3) ist nur noch eine geringe Hemmung festzustellen. Die Werte liegen nur wenig unter denjenigen der ungehemmten Kontrollen. Ein ähnlicher Reaktionsverlauf findet im Hellrot statt (Tab. 2). Im Dunkelrot wird der Reaktionsstillstand aufgehoben und bereits nach 4 Stunden

eine relativ hohe Reaktion von 73 % erreicht. Polarographisch läßt sich eine Sauerstoffanreicherung nachweisen, was für eine Anregung von Photosystem II spricht.

Zusammenfassend zeigen die Versuche mit DCMU unterschiedlicher Konzentration im Weißlicht, Hellrot und Dunkelrot, daß die abnehmende Hemmung der DCMU-behandelten Präparate einer zunehmenden Entthemmung des nicht-zyklischen Elektronentransportes entspricht.

Experimente mit A n t i m y c i n A

Die Ergebnisse der Experimente mit DCMU ergaben keine Hinweise auf eine zyklische Photophosphorylierung. Sie muß vielmehr danach als ausgeschlossen angesehen werden, da bei $2,5 \times 10^{-6} \text{ m}$ DCMU im Dunkelrot keine Reaktion erfolgt.-

Es gibt zahlreiche Hinweise aus der Literatur, daß die zyklische Phosphorylierung an energieabhängigen Prozessen in der lebenden Zelle beteiligt ist, z.B. die anaerobe Assimilation von Glukose durch Chlorella (TANNER et al. 1965) und Nitella (SMITH 1967), die Bildung von Enzymen, der Isocitratlyase, (SYRETT 1966), der Einbau markierten Phosphats in verschiedene Phosphatfraktionen (ULLRICH und SIMONIS 1969) sowie die Erhöhung des ATP-pools (URBACH und KAISER 1972).

Es soll der Nachweis der zyklischen Phosphorylierung während der Chloroplastenentfaltung unter Einsatz des Hemmstoffes Antimycin A geführt werden.

Die Versuchsergebnisse sind in Abbildung 22 zusammengefaßt. Antimycin A blockiert die Reaktion im Dunkelrot vollständig (durchgezogene Kurve), im Hellrot ist keine Hemmwirkung nachzuweisen. Diese Ergebnisse bestätigen den Ablauf der zyklischen Phosphorylierung in der Mougeotia-Zelle. Allerdings ist der Schluß, daß die ungehemmte Reaktion im Dunkelrot energetisch ausschließ-

lich von der zyklischen Phosphorylierung abhängt, unzulässig, da Dunkelrot auch Photosystem II anregt, wie aus den Versuchen mit DCMU hervorging.

*Einfluß von Antimycin A auf die
Chloroplastenverlagerung im HR und DR*

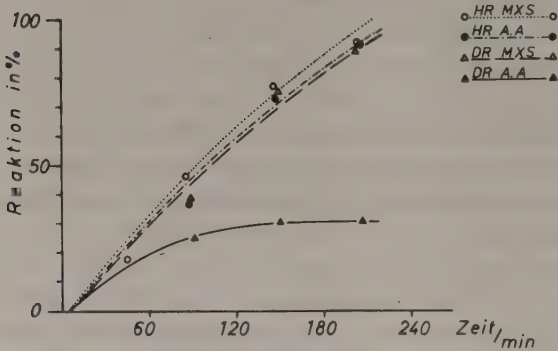


Abb. 22 : Einfluß von Antimycin A $2 \times 10^{-5} \text{ m}$ auf die Chloroplastenstreckung im Hellrot 664 nm $4000 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$ und Dunkelrot 723 nm $4000 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$
Versuchsdurchführung im $\text{N}_2\text{-CO}_2$ -Gemisch

Experimente mit D B M I B

DBMIB soll die enzymatische Reoxidation von Plastochinon hemmen. Wenn man den Redoxcarrier Plastochinon im HILL-BENDALL-Schema (Abb. 18) sowohl als Glied des nicht-zyklischen als auch des zyklischen Elektronentransportes einordnet, dann sollte sowohl eine Hemmung im Hellrot als auch im Dunkelrot erwartet werden.

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse einer vergleichbaren Serie von Experimenten zusammengestellt, die die konzentrationsabhängige Hemmung dieses Hemmstoffes zeigen. Es wurden - wie bereits in den DCMU-Versuchen - jeweils Weißlicht bzw. Hellrot bzw. Dunkelrot eingestrahlt.

Tabelle 3: Wirkung von DBMIB auf die Chloroplastenrückverlagerung im Weißlicht 2100 Lux, Hellrot 664 nm 1000 erg/cm².sec und Dunkelrot 723 nm 7000 erg/cm².sec;
Reaktion nach 2 Stunden in %

	WL	HR	DR	
2,5 x 10 ⁻⁶ m	33	71	40	
	11	0	27	Differenz
MXS-Vergleich	44	71	67	
5 x 10 ⁻⁶ m	35	33	19	
	17	36	50	Differenz
MXS-Vergleich	52	69	69	
10 ⁻⁵ m	21	17	15	
	29	70	68	Differenz
MXS-Vergleich	50	87	83	

Mit steigender DBMIB-Konzentration ist eine zunehmende Hemmung in allen Lichtqualitäten festzustellen. Die Differenzen in der Reaktion zwischen DBMIB-Präparaten und MXS-Kontroll-Präparaten vergrößern sich mit steigender DBMIB-Konzentration. Zur Verdeutlichung sind diese Differenzen gegen die Hemmstoffkonzentration in Abbildung 23 aufgetragen. Im Hellrot hemmt 2,5 x 10⁻⁶m DBMIB nicht, 5 x 10⁻⁶m bewirkt eine deutliche Hemmung, die bei einer Konzentrationserhöhung bis auf 10⁻⁵m DBMIB verstärkt wird. DBMIB dieser Konzentration bewirkt Reaktionsstillstand. Im Dunkelrot führt 2,5 x 10⁻⁶m DBMIB schon zu einer deutlichen Hemmung. 10⁻⁵m DBMIB führt im Hellrot und Weißlicht (s. Tab. 3) zur vollständigen Hemmung der Rückverlagerung. Die Differenzen für die Rotlichtpräparate sind bei dieser Konzentration

etwa gleich. Die signifikant kleinere Differenz im Weißlicht (Tab. 3) ist auf eine langsamere Reaktion im Weißlicht gegenüber den Rotlichtpräparaten zurückzuführen. Dieses Ergebnis ist insofern bemerkenswert, als in allen Fällen für sättigende Bestrahlungen gesorgt wurde. Diesem Problem soll im nächsten Kapitel nachgegangen werden.

DBMIB bringt den nicht-zyklischen wie auch den zyklischen Elektronentransport zum Erliegen. Der Hemmeffekt zeigt sich im Dunkelrot bei niedrigeren Konzentrationen. Dieses kann durch die unterschiedliche Energieeinstrahlung im Hellrot und Dunkelrot bedingt sein. Die Lichtsättigung liegt im Hellrot niedriger als im Dunkelrot. Sie beträgt im Hellrot $200 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$, im Dunkelrot dagegen $3500 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$. Die im Experiment eingestrahlt $1000 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$ bedeuten die 5-fache Sättigung im Hellrot; für Dunkelrot liegt eine 2-fache Sättigung bei $7000 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$ vor.

Der vermutete Wirkungsmechanismus, wonach dieser Hemmstoff zwischen Photosystem II und I eingreift, und zwar im Bereich der Einmündungsstelle des zyklischen Elektronenweges, kann durch diese Experimente bestätigt werden.

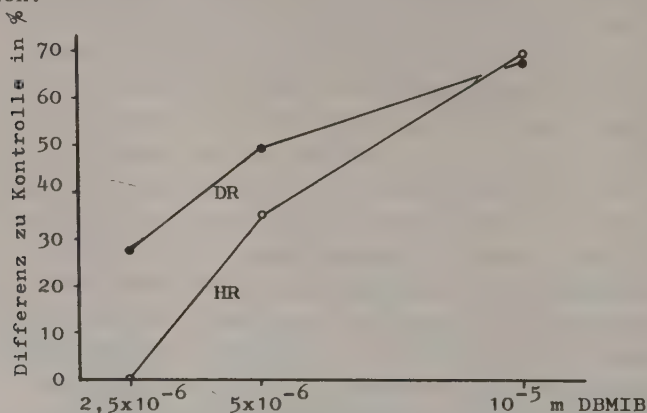


Abb. 23 : Vergleich der konzentrationsabhängigen Hemmwirkung von DBMIB im Hellrot $1000 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$ und Dunkelrot $7000 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$
 Ordinate: Differenzen zwischen den ungehemmten Kontrollpräparaten und den DBMIB-Präparaten

Experimente zum Problem der unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten

Ein Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten zeigt für die Chloroplastenrückverlagerung unter sättigender Weißlichteinstrahlung Schwankungen im Bereich zwischen 4 und 7 Stunden.

Die Chloroplastenstreckung stellt als intrazelluläre Bewegung einen komplexen Vorgang dar. Es konnte gezeigt werden, daß die für diese aktive Bewegung erforderliche Energie aus verschiedenen Stoffwechselprozessen bezogen werden kann. Für den Ablauf der Photosynthese wie auch der Atmung ist die Aktivität zahlreicher Enzyme erforderlich. Eine verminderte Aktivität eines oder weniger dieser Enzyme kann deshalb für die Chloroplastenbewegung von großer Bedeutung sein und möglicherweise unterschiedliche Reaktionsabläufe bedingen. Das Reaktionsgeschehen der Chloroplastenentfaltung kann nicht isoliert betrachtet werden; es muß mit anderen Prozessen des umfassenden Stoffwechsels in Zusammenhang gebracht werden. Für konkrete Abhängigkeiten liegen aber bisher keine Anhaltspunkte vor.

Es ist sicher nicht spekulativ, wenn man als einen wesentlichen Faktor, der bei der Chloroplastenrückverlagerung von Bedeutung sein könnte, an die Lichtperzeption denkt. Die lichtorientierte Chloroplastenbewegung des ungefalteten Chloroplasten erfolgt durch Strahlungsabsorption im Phytochrom. Die Fähigkeit zur Strahlungsabsorption in diesem Sinn, d.h. zur lichtorientierten Verlagerung, bleibt nach der Zentrifugation erhalten wie schon hervorgehoben wurde. Es erscheint daher als nicht unwahrscheinlich, daß dem Phytochromsystem bei der Rückverlagerung eine entscheidende Funktion zukommen könnte.

Die Experimente zum Einfluß von Hellrot und Dunkelrot lassen in allen Fällen schnellere Chloroplastenentfaltungen erkennen (vergl. die MXS-Präparate in den Tab. 2 und 3 sowie Abb. 22). Durch Einstrahlung von Rotlicht kann die Chloroplastenverankerung im cytoplasmatischen Wandbelag beeinflusst werden (Vorversuche S. 28-32). Dabei fragt man sich, ob Dauer-Rotlicht eine Wirkung ausüben kann, wie sie bereits für kurze Hellrot-Induktion nachgewiesen werden konnte (Vorversuche Abb. 12 A); also hier eine Lockerung während der Rückverlagerung bewirken kann. Dazu soll die Reaktion im Weißlicht, Hellrot und Dunkelrot miteinander verglichen werden, um Fehlschlüsse durch die Kombination verschiedener Versuchsergebnisse zu vermeiden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

Vergleich der Chloroplastenverlagerung im HR und DR in N_2-CO_2 und Luft mit der Bewegung im Wl in N_2-CO_2

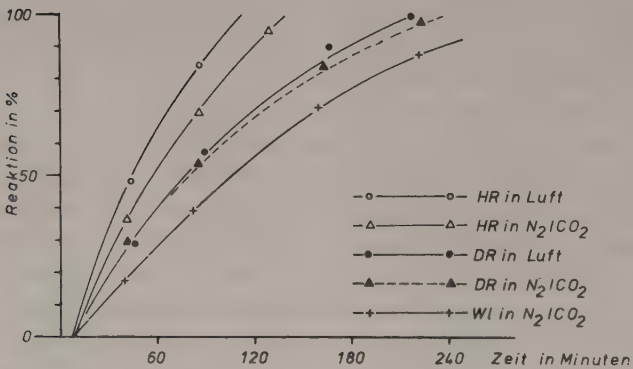


Abb. 24: Vergleich der Chloroplastenverlagerung im HR 664 nm 5700 erg/cm².sec und DR 723 nm 5700 erg/cm².sec in N_2-CO_2 und Luft mit der Bewegung im Wl 2100 Lux in N_2-CO_2
"Stamm Erlangen"

Hellrot wie Dunkelrot fördern die Reaktion gegenüber Weißlicht. Die schnellste Reaktion wird in dieser Serie im Hellrot an der Luft gemessen. Nach knapp 2 Stunden hat sich der Chloroplast vollständig gestreckt. Im N_2 - CO_2 -Gemisch wird eine Reaktion von 85 % registriert. Die Differenz der Ergebnisse unter aeroben und anaeroben Bedingungen ist nicht signifikant. In fast allen Reproduktionsversuchen wurde annähernd gleiche Reaktionsgeschwindigkeit im N_2 - CO_2 -Gemisch und Luft gefunden. In jedem Fall ist die Reaktion im Hellrot aber schneller als im Dunkelrot. Für Dunkelrot-Präparate sind die Kinetiken der Chloroplastenentfaltung unter aeroben und anaeroben Bedingungen übereinstimmend. Nach knapp 2 Stunden sind Reaktionen von 65 bzw. 67 % erreicht. Deutlich verlangsamt erscheint dagegen die Reaktion im Weißlicht, nach knapp 2 Stunden sind erst 52 %, gegenüber 100 % im Hellrot erreicht.

Energetisch erfolgen diese Reaktionen alle im Bereich der vollen Sättigung, für Weißlicht ca. 5-facher Sättigungswert, Dunkelrot ca. 1,5-facher und Hellrot sogar 28-facher Sättigungswert. Schon daraus ist zu erkennen, daß die verschiedenen Reaktionsgeschwindigkeiten nicht über unterschiedliche limitierend wirkende Einflüsse der Energetik gedeutet werden können. Die höhere Reaktionsgeschwindigkeit im Hellrot wäre darauf zurückzuführen, daß die 28-fache Intensität der einfachen Sättigung eingestrahlt wird, doch sind die gleichen Unterschiede im Bereich der Sättigung (Hellrot $200 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$; Dunkelrot $3500 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$) nachzuweisen. Die fördernde Wirkung kann also nicht mit einem erhöhten ATP-Angebot erklärt werden. Es ist wahrscheinlich, daß Rotlicht vor allem über die Mechanik wirkt und weniger über die Energetik.

Positive Reaktionsbeeinflussung durch Dunkelheit

In den Versuchen zur Beeinflussung der Chloroplastenverankerung vor der Zentrifugation bewirkte Hellrot im Fall des "Stammes Erlangen" eine Lockerung. Man fragt sich, ob enge Beziehungen zwischen einer Sensibilisierung durch Dunkelheit, die ebenfalls eine Lockerung der Haftfestigkeit des Chloroplasten im Cytoplasma-Wandbelag bewirken kann (s. Abb. 9 B) und der Chloroplastenentfaltung im DD bestehen. Bisher wurde keine Reaktion in diesem Sinn gemessen. Abbildung 19 zeigt für den "Stamm Tübingen" keinen Unterschied zwischen der Reaktion im Dauerdunkel in Luft und mit 1000 Lux Weißlicht (vergl. 19 A und B). Für den "Stamm Erlangen" allerdings konnte die Bestätigung der Vermutung erbracht werden, d.h. die Reaktion läuft im DD rascher ab als in Weißlicht. Das Ergebnis ist in Abbildung 25 dargestellt.

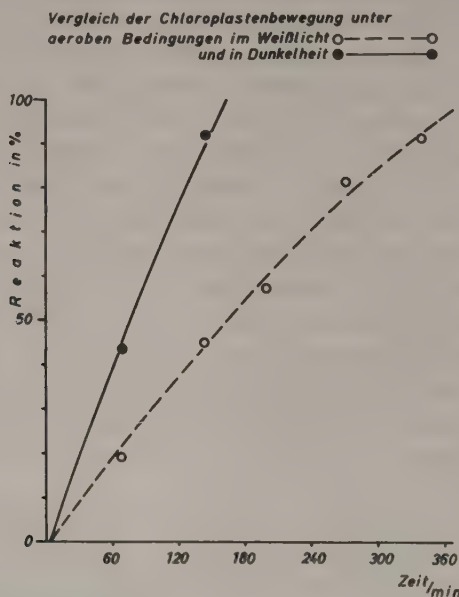


Abb. 25: "Stamm Erlangen"
Vergleich der Chloroplastenverlagerung unter
aeroben Bedingungen im Weißlicht 3200 Lux und in DD

Während im DD unter genannten Versuchsbedingungen die Energie allein aus der oxidativen Phosphorylierung bezogen werden kann, steht im Weißlicht zusätzlich die Photophosphorylierung zur Energieversorgung zur Verfügung. Kann das unterschiedliche Verhalten damit erklärt werden, daß Beziehungen zwischen dem Ort der ATP-Bildung und dem Ort des ATP-Verbrauchs, dem [^]Reaktionsort, bestehen ? Für den in Abbildung 25 dargestellten Fall wäre auf eine bevorzugte Nutzung des in den Mitochondrien synthetisierten ATP's zu schließen. Die Wirkung des Hellrot wie auch des Dunkelrot (Abb. 24) spricht dagegen, denn wird HR oder DR eingestrahlt, so läuft sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen die Reaktion schneller ab als im Weißlicht im N_2 - CO_2 -Strom. In Stickstoffatmosphäre ist allein die Aktivität des Photosyntheseapparates für den Ablauf der Reaktion entscheidend, gleichgültig, ob Weißlicht, Hellrot oder Dunkelrot eingestrahlt wird. Der Unterschied in den Reaktionsgeschwindigkeiten kann also nicht mit der bevorzugten Nutzung einer Energiequelle, sei es der Photophosphorylierung oder der oxidativen Phosphorylierung begründet werden. Im Dauerdunkel ist nach ca. 2 Stunden die Chloroplastenstreckung vollständig erfolgt (s. Abb.25). Eine vergleichbare Reaktionsgeschwindigkeit wird unter Hellrot- sowie Dunkelrotbestrahlung im N_2 - CO_2 -Strom erreicht (s. Abb. 24). Die Energiequellen sind sicher nicht identisch. Es besteht also keine bevorzugte Nutzung einer Energiequelle.

Zusammenfassend ergeben diese Versuche, daß im Rotlicht wie im Dauerdunkel die Reaktion schneller abläuft als im Weißlicht.

An dieser Stelle muß noch einmal auf die Abbildung 24 eingegangen werden. Zunächst, als zum ersten Mal gezielte Experimente zum Nachweis einer Reaktionsbeschleunigung im DD durchgeführt wurden, ist es nicht gelungen, einen Unterschied im Vergleich zur Reaktion im Weiß-

licht festzustellen. Es zeigte sich auch für den "Stamm Erlangen" gleiches Verhalten wie für den "Stamm Tübingen" (vergl. Abb. 19 A und B). Nachdem diese Frage zunächst negativ beantwortet werden mußte, traten ca. 2 Wochen später diese signifikanten Unterschiede auf. In der Literatur werden derartige Phänomene, daß das physiologische Reaktionsvermögen starken Schwankungen unterworfen ist, häufig als "Stimmung" des Versuchsmaterials bezeichnet. Ursachen für einen derartigen Stimmungswandel werden in der Regel nicht angeführt. In der Diskussion wird darauf näher einzugehen sein.

Sensibilisierung und Reaktionsablauf

Für den "Stamm Erlangen" ist die Verankerung des Chloroplasten sowohl durch eine 40-minütige DD-Phase wie auch durch eine 20-minütige Weißlichtphase und anschließend dem Hellrot von 3 Minuten Dauer zu lockern (s. Abb. 9 B und 12 A, B). Es sollte deshalb weiter versucht werden, ob sich die unterschiedliche Sensibilisierung in der Reaktionskinetik bemerkbar macht. Ergebnisse entsprechender Untersuchungen sind in Abbildung 26 dargestellt.

Reaktionsverlauf im Weißlicht und in Dunkelheit in Luft nach unterschiedlicher Sensibilisierung

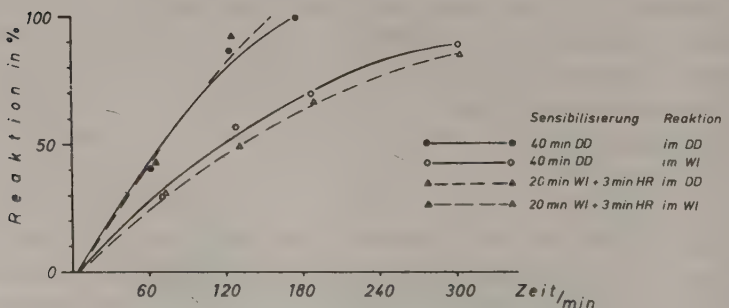


Abb. 26: Reaktionsverlauf im Weißlicht und in Dunkelheit in Luft nach unterschiedlicher Sensibilisierung "Stamm Erlangen"; Reaktion: Weißlicht 3000 Lux

Sensibilisierung: Weißlicht 3000 Lux
HR 10800 erg/cm². sec

Es sind zwei gleiche Kinetiken zu sehen: Die Algen im Weißlicht reagieren u n a b h ä n g i g von der Sensibilisierung annähernd gleich. Nach 160 Minuten beträgt die Reaktion 58 bzw. 63 %. Die Algen im DD reagierten deutlich schneller, nach 160 Minuten sind die Chloroplasten entfaltet, ebenso u n a b h ä n g i g von der Sensibilisierung. Es ist festzuhalten, daß die Beeinflussung der Chloroplastenverankerung v o r der Zentrifugation keine Wirkung auf die Reaktion des Chloroplasten n a c h der Zentrifugation hat. Eine Langzeitwirkung der Sensibilisierung kann daher ausgeschlossen werden.

Experimente zur Bewegungsmechanik

Theoretische Einleitung

Es konnte nachgewiesen werden, daß die Chloroplasten-rückverlagerung eine aktive Bewegung ist. In den folgenden Versuchen soll die Frage nach dem wirksamen Bewegungsmechanismus einer Klärung näher gebracht werden. Es bieten sich zwei Arbeitshypothesen an, deren Anwendung auf diese Frage erfolversprechend erscheint.

Bekannte Bewegungen tierischer wie pflanzlicher Organismen, wie die Plasmaströmung in Characeen-Internodialzellen, die pulsierenden Fließbewegungen der Myxomyceten-Plasmodien, die Kriechbewegungen der Amöben, die Geißelbewegung von Ein- und Vielzellern und die Chromosomenbewegung während der Karyokinese ließen sich unter Anwendung dieser Hypothesen interpretieren, bzw. experimentell erfolgreich bearbeiten.

Eine Gruppe der genannten Bewegungen und darüberhinaus zahlreiche weitere sind auf die Aktivität von Mikro-tubuli zurückzuführen, dazu gehört die Cilienbewegung. Der Mechanismus der anderen Gruppe der genannten Bewegungen basiert auf der Fähigkeit bestimmter Eiweißmoleküle zu Kontraktionen. Nach diesem Prinzip erfolgt die Kontraktion des quergestreiften Muskels.

Beginnen wir mit der Erläuterung des Aufbaus und dem möglichen Bewegungsmechanismus der M i k r o t u b u l i. Im elektronenmikroskopischen Bild erscheinen die Mikrotubuli als lange, fädige Strukturen. Im Querschnitt ist ein äußerer Ring von 240 Å Durchmesser von einem zentralen Hohlraum zu unterscheiden. Der elektronendichte Ring setzt sich aus 40 - 50 Å im Durchmesser großen globulären Untereinheiten zusammen. Etwa 13 dieser Einheiten bilden einen Umlauf, wobei sie in der Längsrichtung des Mikrotubulus annähernd auf gleicher Höhe angeordnet sind und sogenannte Protofilamente

bilden. Die biochemische Analyse ergab, daß es sich bei den Untereinheiten um dimere Moleküle handelt vom Molekulargewicht 120 000 und der Sedimentation von 6 S. An den Mikrotubuli können in regelmäßiger Anordnung Fortsätze beobachtet werden, sog. Querbrücken. Ihre Ausbildung und Organisation hängt stark vom untersuchten Objekt ab. Diese Querbrücken sind in Abhängigkeit vom untersuchten Objekt 20 - 50 Å dick und 100 - 400 Å lang. Gewöhnlich werden diese lateralen Fortsätze zwischen benachbarten Mikrotubuli gefunden; sie können auch in Lagebeziehungen zu Vesikeln, dem ER oder der Plasmamembran gefunden werden. Aus dem Axostyl von Saccinobaculus, einem Protozoon, konnten Mikrotubuli-bündel, die untereinander durch Querbrücken verbunden sind, isoliert werden (MCINTOSH 1973; MOOSEKER & TILNEY 1973); auf Zugabe von ATP begannen sie zu schlagen. Neben dem T u b u l i n , der Substanz der globulären Untereinheiten, fand man bei der biochemischen Analyse Komponenten mit einem höheren Molekulargewicht. Dieser Komponente wird die ATP-ase-Aktivität zugeschrieben; sie soll in den Querbrücken lokalisiert sein. Die ATP-ase-Aktivität konnte in isolierten Spindelapparaten von Seeigeleiern durch Ca^{++} -Ionen aktiviert werden. C o l c h i c i n , das "Mitosegift", soll an den globulären Tubulin-Untereinheiten angreifen.

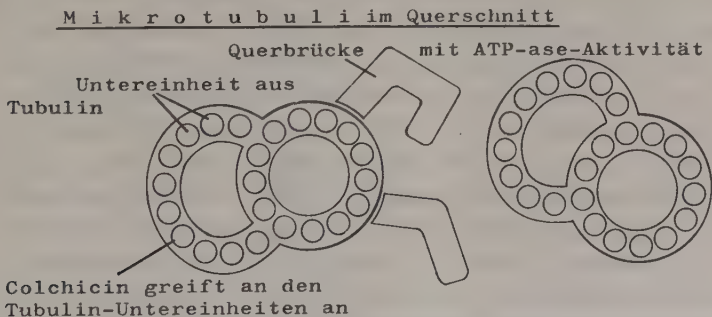


Abb. 27: Schematische Zeichnung zur Erläuterung des Mikrotubuliebaus (nach WARNER & SATIR 1973, verändert)

Zur Erklärung des der Muskelkontraktion zugrundeliegenden Mechanismus soll die schematische Abbildung 28 dienen.

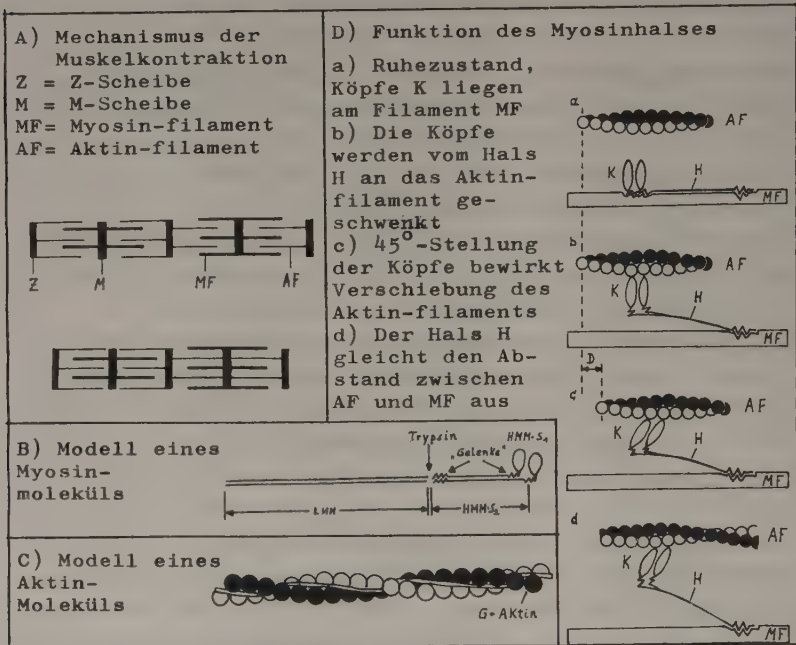


Abb. 28: Schematische Zeichnung zur Erläuterung des Aktomyosin-Modells (nach MANNHERZ und SCHIRMER 1970, verändert)

Die Z-Membranen als Begrenzung des Sarkomers, der Funktionseinheit, bestehen aus einem Gerüstprotein. In jeder Z-Scheibe sind ca. 2000 dünne Filamente, Aktinfilamente, befestigt, etwa 50 Å dick und 5000 Å lang. Sie erreichen die Mitte des Sarkomers, die M-Scheibe, nicht. In der Mitte des Sarkomers liegt die M-Scheibe, die ebenfalls aus einem Gerüstprotein besteht. In dieser Scheibe sind ca. 1000 Filamente, Myosinfilamente, verankert; sie sind etwa 100 Å dick und 15 000 Å (2 x 7500) lang. Während der stabförmige Anteil des Moleküls (s. Abb. 28 B)

aus umeinandergewundenen Proteinketten besteht, handelt es sich bei den beiden terminalen Untereinheiten um mehr globuläre Polypeptide vom Molekulargewicht 225 000. Die enzymatische Zerlegung des Myosinmoleküls führt zu den in Abb. 28 B benannten Untereinheiten HMM-S₁, HMM-S₂ und LMM. In den mit HMM-S₁ (heavy meromyosin subfragment 1) bezeichneten Untereinheiten liegt ein ATP-ase-Zentrum und eine Bindungsstelle für das Aktin.

Das Aktinfilament wird aus globulären Einzelmolekülen aufgebaut. Diese globulären Moleküle, G-Aktin genannt, haben einen Durchmesser von 55 Å bei einem Molekulargewicht von 45 000. Unter den Bedingungen wie sie in der Zelle bestehen polymerisieren etwa 200 G-Aktin-Moleküle zum fädigen F-Aktin. Je 2 Ketten des F-Aktins bilden in einer rechtsläufigen Schraube umeinandergewunden ein Filament des Sarkomers. Gibt man in vitro isolierten F-Aktinmolekülen isolierte Myosinköpfe (HMM-S₁ + HMM-S₂) zu, dann reagieren diese Komponenten charakteristisch, indem sich die Myosin-Teilmoleküle in einem Winkel von 45° an das F-Aktin anlagern, und zwar alle gerichtet, als Ausdruck der polaren Eigenschaften der Filamente. Zyklische Wechselwirkungen dieser Art sollen in vivo die Ursache der Muskelkontraktion sein. In höchster Vollendung arbeiten die Sarkomere in der quergestreiften Wirbeltiermuskulatur (s. Abb. 28 D).

Experimentell lassen sich Aktomyosineigenschaften durch folgende in-vitro-Reaktionen nachweisen:

1. Die Löslichkeit hängt von der Ionenstärke des Lösung ab.
2. Unter Einwirkung von Trypsin zerfällt Myosin in die Untereinheiten HMM und LMM; HMM ist wasserlöslich und besitzt ATP-ase-Eigenschaften.
3. Myosinmoleküle aggregieren beim Verdünnen der Salzlösung, in der sie gelöst sind, zu Fasern.
4. Aktin zeigt keine enzymatischen Eigenschaften
5. In ionenfreiem Wasser liegen die globulären G-Aktin Moleküle vor, durch Zugabe von Neutralsalzen bildet sich F-Aktin.

6. Weder Aktin noch Myosin sind für sich allein kontraktile.
7. Behandelt man F-Aktin mit HMM, so bildet sich ein charakteristischer Komplex durch die polare Anlagerung von HMM im Winkel von 45° .
8. Der Aktomyosinkomplex dissoziiert auf Zugabe von ATP, das entspricht einer Viskositätsabnahme der Lösung.
9. Der Aktomyosinkomplex kann unter definierten Bedingungen auf ATP-Zugabe mit einer Kontraktion reagieren, Superpräzipitation genannt.
10. Die Aktivität des Komplexes ist durch Ca^{++} - und Mg^{++} -Ionen beeinflussbar.

Nachdem zunächst Proteine des Aktomyosintyps aus Myxomyceten-Plasmodien isoliert werden konnten (TS'0 et al. 1956, "Myxomyosin"; NAKAJIMA 1960, "Plasmodialmyosin B"), ist es inzwischen auch gelungen, aktin-artige Proteine aus Internodialzellen von Characeen zu isolieren, aus Zellen mit lebhafter Plasmaströmung (WILLIAMSON 1974; PALEVITZ et al. 1974).

Die Größenordnungen der Strukturproteine, seien es Mikrotubuli oder Aktomyosinfilamente, liegen an der Grenze des Auflösungsvermögens der lichtmikroskopischen Methoden. Einzelfilamente lassen sich ohnehin nicht auflösen, sondern nur Filamentbündel. Mit dem Interferenz-Kontrast-Mikroskop ist es gelungen, in besonders günstigen Fällen derartige Strukturen sichtbar zu machen und mit Bewegungsvorgängen wie der Plasmaströmung und Chloroplastenbewegung in Zusammenhang zu bringen (REBHUN 1972).

Der Einsatz des Elektronenmikroskops erleichtert zwar die Identifizierung derartiger filamentöser Strukturen, erschwert jedoch die Zuordnung zu Bewegungsvorgängen in der lebenden Zelle.

Mit Hilfe von Hemmstoffen ist es aber möglich, experimentell Entscheidungen für oder gegen die Beteiligung des einen oder des anderen geschilderten Mechanismus zu treffen. Als solche Hemmstoffe haben sich Colchicin, PCMB und Cytochalasin B bewährt.

Versuche mit den Hemmstoffen Colchicin, PCMB und Cytochalasin

C o l c h i c i n

Der Mechanismus der Hemmung durch Colchicin als Reaktion mit den Untereinheiten der Mikrotubuli-Proteine (s. Abb. 27) ist unbestritten und als spezifische Reaktion auf Mikrotubuliaktivitäten anerkannt.

SCHÖNBOHM (1973 a) konnte keine Hemmwirkung auf die Chloroplastendrehung bei Mougeotia feststellen. Colchicin übt auch auf die Chloroplastenentfaltung nach der Zentrifugation in physiologisch verträglichen Konzentrationen keine Hemmwirkung aus.

Dieses Ergebnis spricht gegen die Beteiligung von Mikrotubuli an der untersuchten Reaktion.

P C M B , p-Chloro-mercuri-benzoat

PCMB gilt als spezifisches SH-Gruppen-Reagens. Es soll die reaktiven SH-Funktionen in Proteinen besetzen und damit seine Hemmwirkung entfalten.

ABE (1964) demonstrierte den Effekt des Hemmstoffes auf die Protoplasmaströmung in Internodialzellen von Nitella flexilis und Blattzellen von Elodea densa. 10^{-3} m PCMB bringt nach wenigen Minuten die Strömungsbewegung zum Erliegen. 10^{-4} m PCMB führt ebenfalls zum Stillstand der Plasmabewegung, doch erst nach 30 Minuten bis 3 Stunden. 10^{-5} m PCMB bleibt ohne Wirkung.

Die Hemmung kann durch Zugabe von SH-Gruppen tragenden Molekülen wie Glutathion oder Cystein im Überschuß aufgehoben werden. Auswaschen mit Nährlösung ist nicht möglich.

SCHÖNBOHM (1972) berichtet für die Starklichtbewegung des Mougeotia-Chloroplasten einen ähnlichen Hemmeffekt,

der im Konzentrationsbereich von 10^{-4} m bis $5 \times 10^{-3} \text{ m}$ auftritt und durch Cystein im Überschuß aufgehoben werden kann. Eine Aufhebung der Hemmwirkung durch ATP-Zugabe ist nicht möglich; es wird sogar eine zunehmende Hemmung bewirkt. PCMB blockiert die Mechanik der Bewegung und nicht die Energetik über eine Hemmung von ATP-ase-Aktivitäten, da PCMB vor der Zentrifugation gegeben die Haftfestigkeit des Chloroplasten im Cytoplasma-Wandbelag lockert, was nicht durch ein vermindertes ATP-Angebot erklärt werden kann. SCHÖNBOHM (1969 a) konnte zeigen, daß die drei Bewegungstypen des Mougeotia-Chloroplasten von unterschiedlichen Energiequellen abhängen. Da aber die Hemmung durch PCMB in allen Bewegungstypen gleich ist, wird darin eine Stütze der obigen Behauptung gesehen, denn es ist unwahrscheinlich, daß ein Hemmstoff verschiedene ATP-asen in gleicher Weise beeinflussen kann. Sollte für die Chloroplastenentfaltung nach der Zentrifugation derselbe Bewegungsmechanismus wie bei der Starklichtbewegung wirksam sein, dann ist auch in diesem Fall mit dem gleichen Hemmeffekt zu rechnen. Die Bestätigung wird durch Ergebnisse erbracht, die in Abbildung 29 dargestellt sind.

Der Vergleich der Säulen A und B zeigt, daß Cystein $5 \times 10^{-3} \text{ m}$ keine Reaktionsbeschleunigung bewirkt. Zusätzliche SH-Gruppen sind im ungehemmten Präparat wirkungslos. PCMB 10^{-5} m hemmt die Chloroplastenstreckung (Säule C), nach 7 Stunden sind 33 % Reaktion erreicht. Werden die PCMB-gehemmten Algen nach 2 Stunden mit $5 \times 10^{-3} \text{ m}$ Cystein-Lösung gewaschen, so wird die Bewegung wieder aufgenommen (Säule D). Nach 7 Stunden sind 71 % Reaktion erreicht. Das Auswaschen mit Serin ist nicht möglich, der Hemmstoff wirkt weiter (Säule E). Serin unterscheidet sich vom Cystein lediglich dadurch, daß die SH-Gruppe im Cystein durch eine OH-Gruppe ersetzt wird. Zur Aufhebung der Hemmung ist ein Cystein-Überschuß, d.h. SH-Gruppenüberschuß erforderlich.

Wirkung von PCMB

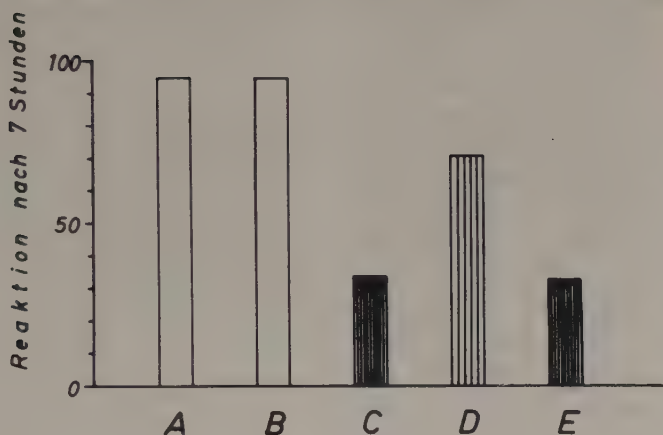


Abb. 29: Wirkung von PCMB 10^{-5} m auf die Chloroplasten-entfaltung. Inkubation nach der Zentrifugation. Die Höhe der Säulen gibt den Reaktionswert nach 7 Stunden an, Ordinate.

Säule: A Kontrollpräparat in MXS

B Cystein $5 \times 10^{-3} \text{ m}$

C PCMB 10^{-5} m

D PCMB 10^{-5} m , nach 2 Stunden mit Cystein
 $5 \times 10^{-3} \text{ m}$ ausgewaschen

E PCMB 10^{-5} m , nach 2 Stunden mit Serin
 $5 \times 10^{-3} \text{ m}$ ausgewaschen

Die Cysteinkonzentration muß wenigstens eine Zehnerpotenz höher sein als die angewandte PCMB-Konzentration. SCHÖNBOHM (1972) erreichte durch wesentlich geringere Differenzen, $5 \times 10^{-4} \text{ m}$ PCMB und 10^{-3} m Cystein, die Aufhebung der Hemmung. Der Grund dafür dürfte in der verschiedenen langen Inkubationszeit liegen. SCHÖNBOHM (1969b) untersuchte die Hemmung in Abhängigkeit von der Inku-

bationszeit. Erst Inkubationszeiten länger 40 Minuten zeigen für 10^{-5} M PCMB Wirkungen auf die Starklichtbewegung. Kürzere Inkubationszeiten sind ohne Wirkung.

C y t o c h a l a s i n B

Die Cytochalasine sind Alkaloide aus Pilzen (CARTER 1967). Zunächst war man der Ansicht, daß Cytochalasin B, der am häufigsten eingesetzte Hemmstoff, dasjenige Zellgift ist, welches spezifisch solche Bewegungen hemmt, an denen kontraktile Filamente des Aktomyosin-Typs beteiligt sind (WESSELS et al. 1971). Bald aber häuften sich die Befunde, daß Cytochalasin B auch Membraneigenschaften verändert (ESTENSEN et al. 1971).

SPOONER et al. (1971) untersuchte den Einfluß von Cytochalasin B (CB) auf Bewegungen und Plasmastrukturen von Glia-Zellen. CB 7 - 10 $\mu\text{g/ml}$ bewirken den Bewegungsstillstand und den Abbau eines Filamentnetzes aus 50 $\text{\AA}$ Filamenten, andere, dickere Filamente 50 - 70 $\text{\AA}$ stark bleiben dagegen unverändert, selbst nach 12 stündiger Einwirkungsdauer der CB-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$. Das Netzwerk, bestehend aus den 50 $\text{\AA}$ Filamenten soll für die Zellbewegung verantwortlich sein. Da nach Auswaschen von CB die Bewegung wieder aufgenommen wird, wird vermutet, daß Präkursoren dieser Filamente in der Zelle vorhanden sind, die schnell zu funktionsfähigen Strukturen aufgebaut werden können. Bemerkenswert ist jedoch die verschiedene CB-Wirkung auf 2 Filament-Typen.

WILLIAMSON (1972) beobachtete die CB-Wirkung auf die Plasmastrukturen von Nitella und Chara in vivo.

25 $\mu\text{g/ml}$ CB bringen nach wenigen Minuten die Plasmaströmung zum Erliegen, nach 30-minütiger Inkubation ist der Hemmeffekt voll reversibel; durch höhere Konzentrationen nach 60 Minuten allerdings irreversibel. Die Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ führt auch zum Stillstand

der Plasmaströmung, doch erst nach 6 Stunden. Filamentöse Plasmastrukturen, die für die Strömungsbewegung verantwortlich sein sollen, bleiben erhalten, dagegen findet im Endoplasma eine Vermehrung kleiner Vakuolen statt. In unbehandelten Zellen sind die Vakuolen in unterschiedlicher Zahl vorhanden. Da ihre Entstehung mit dem ER in Zusammenhang gebracht wird, läge die CB-Wirkung auch in der Beeinflussung von Membraneigenschaften. Die schnelle Reaktivierung der Strömung spricht für eine Reaktivierung der Filamente in situ. CHEN (1973) berichtet über die Wirkung von CB auf die Plasmaströmung von Nitella einen Bewegungsstillstand nach 10 - 25 Minuten, hervorgerufen durch die niedrige Konzentration von 3 - 6 $\mu\text{g/ml}$. Abweichend von den Ergebnissen SPOONER's und WILLIAMSON's ist der Hemmeffekt nicht reversibel.

FORER et al. (1972) konnte in vitro keine Hemmung der Aggregation von G-Aktin zu F-Aktin, noch die Bindung von HMM an F-Aktin, noch die ATP-abhängige Freisetzung des HMM vom F-Aktin durch sehr hohe CB-Konzentrationen erreichen.

SPUDICH & LIN (1972) berichten dagegen von nahezu stöchiometrischer Reaktion zwischen Aktin und CB. Diese Autoren nehmen an, daß CB die Bindungsstelle des Myosins am Aktin besitzt. Die ATP-ase-Aktivität des Aktomyosin-Komplexes wird auf 60 % herabgesetzt. Sie schließen darüber hinaus Membraneffekte nicht aus. PALEVITZ (1972) zog Allium-keimlinge unter CB-Einwirkung an und kontrollierte die Differenzierung der Spaltöffnungsapparate. CB 0,5 - 25 $\mu\text{g/ml}$ stört die Orientierung der Zellplatte der Nebenzellen-Mutterzelle, aberrante Wände werden gebildet, zweikernige Zellen können entstehen und die normale Orientierung von Tochterkernen bleibt aus.

Diese Ergebnisse deuten einerseits auf eine bevorzugte Reaktionshemmung von Bewegungen des Aktomyosin-Typs

hin, andererseits können weniger spezifische Wirkungen von CB nicht abgestritten werden. Der Mechanismus der Hemmung konnte bis heute nicht aufgeklärt werden.

WAGNER et al. (1972) untersuchte die Wirkung dieses Hemmstoffes bezüglich der Induktionsbewegung des Mougeotia-Chloroplasten. Mit steigenden Konzentrationen bis zu 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nimmt auch die Reaktionshemmung zu. Bei der Analyse der Hemmung durch CB war es möglich, die Induktionsbestrahlung von der Reaktion zu trennen, da der Chloroplast die Drehbewegung nach der induzierenden Bestrahlung in Dunkelheit vollführt. Es konnte bewiesen werden, daß die Photoperception von CB nicht beeinflußt wird. CB-Konzentrationen bis zu 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konnten ausgewaschen werden, wogegen 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nicht vollständig auswaschbar waren.

SCHÖNBOHM (1973) bestätigte die konzentrationsabhängige Hemmung von CB bei der Untersuchung der Starklicht- und Schwachlichtbewegung. Konzentrationen bis zu 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sind auswaschbar, wenn die Hemmstofflösung nach wenigen Minuten durch Nährlösung ersetzt wird.-

Die konzentrationsabhängige Wirkung von CB auf die Chloroplastenentfaltung ist in Abbildung 30 dargestellt.

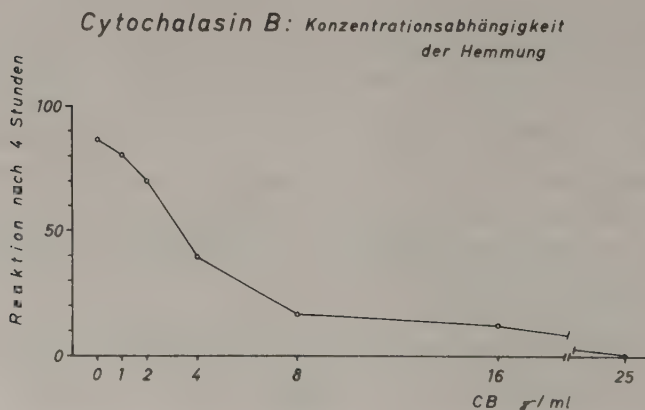


Abb. 30: Hemmung der Chloroplastenentfaltung durch Cytochalasin B. Weitere Angaben im Text.

Die Kontrolle zeigt nach 4 Stunden eine Reaktion von 87 %. Die Chloroplastenentfaltung wird durch vergleichsweise niedrige Konzentrationen gehemmt: Schon $8 \mu\text{g/ml}$ bewirken totalen Reaktionsstillstand, nachdem in der Anfangsphase eine 17 %-ige Reaktion möglich ist. Durch $25 \mu\text{g/ml}$ wird die Reaktion sofort und total blockiert. Dieser Befund läßt Rückschlüsse auf die Kinetik der Chloroplastenentfaltung zu. Der unmittelbar nach der Zentrifugation vorliegende Wert des Zentrifugationseffekts verändert sich nicht: Es sind also keine passiven Bewegungsanteile an der Entfaltung beteiligt, wie es bereits aus der Interpretation des Bewegungsablaufs in Abbildung 15 gefolgert wurde. Die geringen Reaktionen bei 8 und $16 \mu\text{g/ml}$ sind dadurch erklärbar, daß der Hemmstoff, der erst nach der Zentrifugation zugesetzt wird, zwar schnell in die Zellen eindringt, die aktiven Zentren der Bewegungsmechanik aber erst langsam besetzt. Die dreifache Hemmstoffkonzentration ist in der Lage, die Bewegungsmechanik in kurzer Zeit, es dürfte sich höchstens um Minuten handeln, zu besetzen. Sowohl WAGNER et al. als auch SCHÖNBOHM müssen zur Erreichung der vollständigen Hemmung mindestens $50 \mu\text{g/ml}$ einsetzen.

Im Unterschied zu PCMB kann CB mit einfacher Nährlösung ausgewaschen werden. In Abhängigkeit von der Einwirkungs-dauer wird die Chloroplastenstreckung fortgesetzt, s. Abbildung 31. Kurve A zeigt den Reaktionsverlauf der ungehemmten Kontrolle. Die Cytochalasin-Konzentration von $8 \mu\text{g/ml}$ führt zum Reaktionsstillstand (Kurve E, vergl. mit Abb. 30). Ersetzt man die Hemmstofflösung nach 70 Minuten nach wiederholtem Auswaschen durch Nährlösung, so wird die Hemmwirkung aufgehoben, Kurve B. Dasselbe gilt, wenn die Auswaschung nach 135 Minuten erfolgt, Kurve C. In diesem Fall ist noch eine vollständige Streckung der Chloroplasten nach mehreren Stunden möglich. Wirkt der Hemmstoff aber länger als 4 Stunden ein, so ^{ist} zwar eine beschränkte Reaktion nach

der Auswaschung zu beobachten, doch erfolgt keine vollständige Reaktion mehr. Während der langen Inkubationszeit von über 4 Stunden hat Cytochalasin B offensichtlich nicht nur die Bewegungsmechanik angegriffen, sondern darüber hinaus weniger spezifische Wirkungen entfaltet, möglicherweise sind Membransysteme beschädigt worden. SCHÖNBOHM (1975) analysierte die Veränderungen von Plasmastrukturen im Verlauf der Starklichtbewegung des Chloroplasten. Mit dem Interferenz-Kontrast-Mikroskop konnte kein Abbau von Plasmastrukturen durch CB nachgewiesen werden.

Cytochalasin B: Auswaschbarkeit

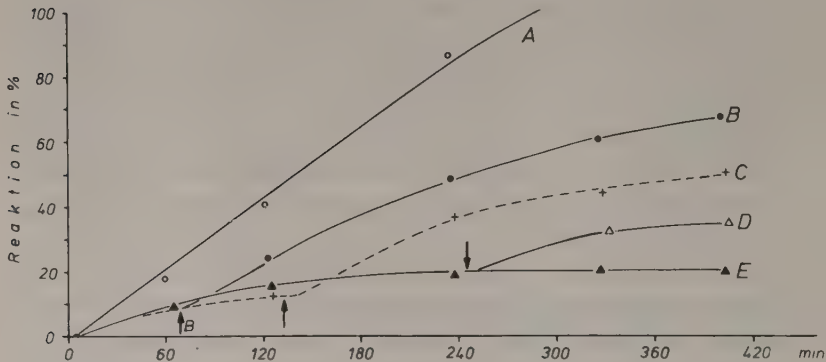


Abb. 31: Auswaschbarkeit von Cytochalasin B nach verschieden langen Inkubationszeiten.
Cytochalasin B: 8 $\mu\text{g/ml}$

Zusammenfassend lassen die Hemmstoffexperimente zur Untersuchung der Chloroplastenentfaltung eine Parallelität mit den entsprechenden Untersuchungen zur Bewegungsmechanik der lichtorientierten Chloroplastenbewegung erkennen.

Anhang:

Das Ziel jeder lichtphysiologischen Analyse ist, den Photorezeptor der das induzierende Licht absorbiert zu identifizieren; dazu wird ein Wirkungsspektrum erstellt, das im Idealfall im Verlauf dem Absorptionsspektrum des gesuchten Photorezeptors entspricht.

Die Untersuchungen dieser Arbeit sollten u.a. die Lichtabhängigkeit der Chloroplastenrückverlagerung analysieren unter besonderer Berücksichtigung der Abhängigkeit der Rückverlagerung von dem jeweiligen Spektralbereich.

Für die Energetik der Chloroplastenentfaltung ist die Photosynthese unter Anaerobiose von Bedeutung. Manche Spektralbereiche regen jedoch nicht ausschließlich die verschiedenen Pigmente des Photosyntheseapparates an. Es ist bekannt, daß im Blaubereich der für die Starklichtbewegung des *Mougeotia*-Chloroplasten verantwortliche Photorezeptor, vermutlich ein Flavin oder Flavoprotein angeregt wird. Eine zweite nicht photosynthetische, lichtabhängige Komponente ist das Phytochrom; es konnte als Photorezeptor der Schwachlichtbewegung identifiziert werden. Bei der Analyse der spektralen Abhängigkeit der Chloroplastenrückverlagerung kann man deshalb nicht zu einem Wirkungsspektrum gelangen, aus dem man auf einen bestimmten Photorezeptor schließen kann; denn die quantitative Beteiligung der verschiedenen Pigmente an den Lichtreaktionen, die bei diesem Prozeß eine Rolle spielen, kann nicht abgeschätzt werden. Dennoch wurde der Versuch unternommen, mit quantengleicher Strahlung ein grobes Wirkungsspektrum zu erarbeiten. Bei der Auswahl der Spektralbereiche wurden die Absorptionsmaxima der beiden Phytochromformen ausgewählt. Daneben erschien es sinnvoll die Wirksamkeit des "safe-light's" bei 533 nm als Dauerlicht zu messen, wie auch das vermutliche Absorptionsmaximum des Starklichtphotorezeptors bei 470 nm und den Blau-

bereich des Chlorophylls bei 428 nm und einen Wellenlängenbereich unter 400 nm.

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse dieser Experimente zusammengestellt.

Tabelle 4: Wirksamkeit einiger ausgewählter Spektralbereiche (Mittelwerte aus 5 Messungen) in N_2-CO_2 -Atmosphäre
quantengleiche Einstrahlung: $200 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$
bezogen auf 662 nm

Strahlung Filter Halbwerts- breite	Reaktion in % nach 4,5 Stunden	
		korrigiert durch Abzug der DD-Reaktion
A1 396 25 nm	43,8	29,1
A1 428 20 nm	60,3	45,6
A1 470 18 nm	67,0	52,3
DAL 533 18 nm	63,0	48,3
DAL 662 19 nm	89,8	75,1
A1 726 19 nm	21,4	6,7
DD-Präparat	14,7	----

Hellrot wirkt am stärksten, Dunkelrot am schwächsten. In der Größenordnung stimmen diese Werte mit jenen überein, die bei der Erstellung von Dosis-Effekt-Kurven gefunden wurden, wonach die Lichtsättigung im Hellrot bei einer Intensität von $200 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$ und im Dunkelrot bei einer Intensität von $3500 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$ liegt. Wie schon erwähnt, kann die höhere Wirksamkeit von Hellrot nicht allein durch die stärkere ATP-Synthese erklärt werden, sondern Hellrot wirkt auch durch Absorption im Phytochromsystem auf die Mechanik der Reaktion.

Wie kinematographische Untersuchungen von SCHÖNBOHM &

HAUPT gezeigt haben (SCHÖNBOHM & HAUPT 1975), läuft bei kontinuierlicher Bestrahlung die Chloroplastenschwachlichtbewegung auch im safe-light ab; daher sollte auch die Wirksamkeit des grünen Spektralbereichs (533 nm) auf die Chloroplastenentfaltung im Dauerbestrahlungsexperiment untersucht werden. Unter diesen Bedingungen (Dauerlicht) erwies sich dieser Spektralbereich als sehr wirksam, was ein weiterer Beweis dafür ist, daß die Chloroplastenentfaltung mit äußerst geringen ATP-Konzentrationen auskommt, die jedoch kontinuierlich bereitgestellt werden müssen.

Im blauen Absorptionsbereich der Chlorophylle ist die Reaktion nur wenig höher als im Grünlicht. Dieser Spektralbereich scheint ausschließlich photosynthetisch wirksam zu sein, denn höhere Intensitäten dieser Strahlung führten zu keiner Reaktionsbeschleunigung wie sie durch Hellrot erreicht werden konnte. Ein Einfluß des Blaulichts auf die Mechanik scheint nicht vorzuliegen.

Die Antriebskraft für die Bewegung bei sättigender Einstrahlung unter anaeroben Bedingungen wie auch unter Luftzutritt ist wahrscheinlich nicht der limitierende Faktor für den Ablauf der Reaktion, der Chloroplastenentfaltung. TAZAWA (1968) konnte die Antriebskraft und die Bewegungsgeschwindigkeit der Protoplasmaströmung an Nitella-Internodialzellen in Abhängigkeit von der Temperatur messen. Die verlangsamte Plasmaströmung bei niedrigen Temperaturen ist in erster Linie auf eine Veränderung der Plasmaviskosität zurückzuführen, denn die Antriebskraft bleibt im Temperaturbereich von 10 - 30 °C konstant.- Die Antriebskraft, die während der Chloroplastenentfaltung wirksam ist, konnte nicht gemessen werden, doch zeigt die Reaktionsgeschwindigkeit eine ähnliche Temperaturabhängigkeit (Abb.32) wie die Plasmaströmung der Internodialzellen von Nitella.

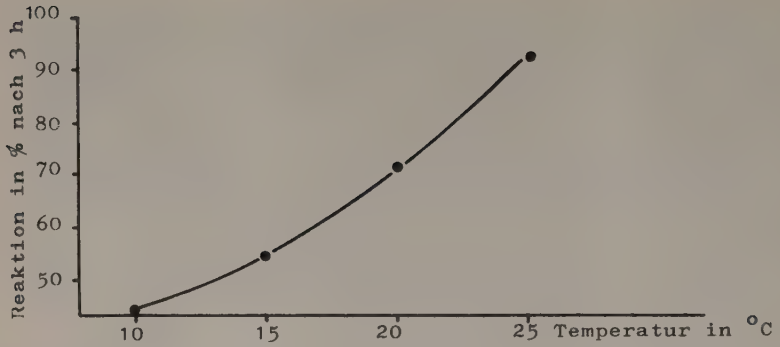


Abb. 32: Temperaturabhängigkeit der Chloroplastenrückverlagerung; gemessen im geschlossenen Kühlkreislauf unter Weißlicht 1000 Lux

D i s k u s s i o n

Zur Diskussion stehen Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Energetik, Mechanik und Photoperzeption bei der intrazellulären Rückverlagerung zentrifugierter Chloroplasten.

a) zur Beeinflussung der Chloroplastenverankerung im cytoplasmatischen Wandbelag

Vorversuche ergaben, daß die Chloroplastenverankerung im cytoplasmatischen Wandbelag eine phytochromgesteuerte Kurzzeitreaktion ist; damit konnten die Ergebnisse von SCHÖNBOHM (1973 b) am "Stamm Tübingen" bestätigt werden. Die beiden in dieser Arbeit untersuchten Stämme verhalten sich bei Bestrahlung mit Dunkelrot und Hellrot nicht gleichsinnig (s. Abb. 12 A): Der "Stamm Tübingen" ist durch Dunkelrot, der "Stamm Erlangen" durch Hellrot sensibilisierbar, d.h. einmal bewirkt Dunkelrot beim "Stamm Erlangen" dagegen Hellrot eine Lockerung der Chloroplastenverankerung im cytoplasmatischen Wandbelag. Die phytochromabhängigen Kurzzeitreaktionen sind nach 4 - 6 Minuten meßbar. Noch kürzere phytochromgesteuerte Reaktionen haben SCHÖNBOHM & HAUPT (1975) mit Hilfe kinematographischer Untersuchungen zum HR-DR-Antagonismus bei der Chloroplastenschwachlichtbewegung gefunden. SCHÖNBOHM (1973 b) fand in Untersuchungen mit polarisiertem Licht eine Abhängigkeit der Abzentrifugierbarkeit von der Schwingungsrichtung des E-Vektors des polarisierten Lichtes. Einen solchen Aktionsdichroismus konnten auch HAUPT & BOCK (1962) beim HR-DR-Antagonismus der Schwachlichtbewegung des Mougeotia-Chloroplasten nachweisen. Das für die Perzeption der lichtorientierten Chloroplastendrehung verantwortliche Phytochromsystem ist im äußersten kortikalen Plasmabereich lokalisiert (BOCK & HAUPT 1961). Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, daß durch die Anregung des im Kortikalplasma lokalisierten Phytochroms die zur Chloroplastenlockerung bzw.

-verankerung führenden Folgeprozesse ausgelöst werden. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen von WEISEN-SEEL & SMEIBIDL (1973) aufschlußreich, die von einer phytochromgesteuerten Änderung der Wasserpermeabilität in Plasmolyseversuchen berichten.

Es kann postuliert werden, daß neben dem im Kortikalk-plasma lokalisierten Phytochrom in weiteren Plasmabe-reichen der Mougeotia-Zelle Phytochrom vorkommt.

HAUPT & WEISENSEEL (1975) vermuten, daß in der Mougeotia-Zelle ein gewisser Anteil ungebundenen Phytochroms in der P_r -Form vorhanden ist. Hinweise, die zu dieser Ver-mutung Anlaß geben, führen sie nicht an.

Die oben erwähnten gegensinnigen Reaktionen der beiden Mougeotia-Stämme bei Bestrahlung mit Hellrot bzw. mit Dunkelrot können ihre Ursache in ungleicher Anzucht des Versuchsmaterials haben. Die Algen des "Stammes Erlangen" wurden seit ca. 1/2 Jahr in vollsynthetischer MXS-Nähr-lösung angezogen; die Algen des "Stammes Tübingen" wurden in ENS-Nährlösung angezogen und erst wenige Tage vor Ver-suchsdurchführung in MXS-Nährlösung überführt. Da Wachs-tumsunterschiede in MXS für die beiden "Stämme" in Dauer-kultur zu verzeichnen waren (s.S.5), kann nicht ausge-schlossen werden, daß das Phytochromsystem, es wird an die Synthese der Vorstufen gedacht, ebenfalls unter-schiedlich ausgebildet wird, d.h. phytochromgesteuerte Reaktionen sind Schwankungen unterworfen. Ein derartiges Beispiel ist in Abb. 13 S. 32 festgehalten. In Abweichung von der überwiegenden Zahl der Fälle ließ sich in diesem Experiment für den "Stamm Erlangen" keine Sensibilisierung d.h. keine Chloroplastenlockerung durch eine Dunkelphase erreichen (vergl. mit Abb 9 B, S. 25). Dasselbe Algenmate-rial ließ sich durch Hellrot erst nach einer Dunkelrot-bestrahlung sensibilisieren. Wenn auch dieses Einzeler-gbnis noch keine definitive Aussage über den Einfluß des Phytochromsystems auf die Chloroplastenverankerung ge-stattet, so können doch Ansatzpunkte zu neuen experimen-

tellen Analysen darin gesehen werden. Systematische Untersuchungen über den Einfluß von Bestrahlungsdauer, -intensität und der Zeit nach der Bestrahlung müßten Aufschlüsse über die durch das Phytochromsystem ausgelösten Folgeprozeßketten erbringen.

HAUPT (1968 p 342) berichtet Ähnliches: "Seit Jahren wird die Arbeit mit *Mougeotia* immer wieder erschwert durch unerklärliche Schwankungen in der Reaktionsfähigkeit." Unerklärliche Schwankungen im Reaktionsverhalten bedeuten für die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen sicher eine Erschwernis, doch gehören die Schwankungen genauso zur in-vivo-Reaktionsbreite des Phytochromsystems wie die Photokonversion von P_r zu P_{fr} und umgekehrt.

b) zum Reaktionsablauf

Es erscheint sinnvoll, der Diskussion über die Wechselbeziehungen zwischen dem sich aktiv entfaltenden Chloroplasten und dem Cytoplasma der Zelle eine Schilderung der Dynamik in der Zelle während des Reaktionsablaufs anhand einiger ausgewählter Beobachtungen voranzuschicken. Die Farbtafel zeigt 7 Stadien der Bewegung. In Bild A sieht man die von 2 Plasmafäden durchzogene Vakuole, nachdem zuvor durch Zentrifugation der Chloroplast zentrifugal verlagert worden ist. Auf diesen Plasmafäden wie auch im cytoplasmatischen Wandbelag sind kleine Granula (Gr) zu erkennen. Die Plasmafäden sind gespannt, was man daran erkennen kann, daß sie die kürzeste Entfernung zwischen Zellquerwand (unten im Bild) und der "Chloroplastenfront" (oben im Bild) überbrücken. Der Faden rechts im Bild verläuft dicht am Cytoplasma-Wandbelag vorbei (weißer Pfeil) hat aber keine Verbindung mit ihm. Die Spannung kann so stark sein, daß an der "Chloroplastenhülle" Zipfel herausgezogen werden. In diesen Fäden sind jedoch keine Elemente der Bewegungsmechanik zu sehen. Sie stellen ausgezogene Plasmastränge

des cytoplasmatischen Wandbelages dar. Die Aufnahme entstand etwa 5 Minuten nach Zentrifugationsende. In den Bildern B und C sind flächige Plasmaverbindungen zwischen der Plasmahülle des Chloroplasten und dem Wandbelag zu sehen. Im Verlauf der beginnenden Entfaltung haben sich die Plasmafäden entspannt und eine Verbindung zum Plasmawandbelag hergestellt (B, Pfeil). Abbildung C zeigt, daß diese Fäden während der Reaktion erhalten bleiben können. In Abbildung D ist der Chloroplast im zentripetalen Teil der Zelle in Kantstellung orientiert. - Plasmastränge können den Chloroplasten girlanden-artig überspannen (Bild E, Pfeile). Die Bilder F und G erbringen den Beweis für den schon vermuteten Ort der Bewegungsmechanik. Bild F zeigt einen sog. "Schiennchloroplasten" wie sie gelegentlich in der Kultur auftreten können (s. auch NEUSCHELER-WIRTH 1970). Die Kern- tasche mit dem Nukleolus ist besonders deutlich zu erkennen (N). Die beiden Schienen des Chloroplasten wandern getrennt und offensichtlich unabhängig voneinander in die Ausgangs- lage zurück. Da die Bewegung der Chloroplastenschienen nicht aus sich heraus, etwa als amöboide Kriechbewegung, erfolgt, wird die Mechanik der Chloroplastenverlagerung in den Bereichen vermutet, die durch die schwarzen Pfeile gekennzeichnet sind: Im Cytoplasma zwischen Zellwand und Chloroplast. Ein weiterer Beweis dafür ist das Verhalten des in Bild G abgebildeten fragmentierten Chloroplasten. Daß es sich um einen zentrifugierten Chloroplasten handelt ist durch den weißen Stern links in der Nachbarzelle hin- reichend bewiesen. Der kleinere Chloroplastenanteil wand- ert völlig getrennt in den chloroplastenfreien Zellbereich zurück; es besteht keine lichtmikroskopisch sichtbare Ver- bindung der Chloroplastenteile (schwarze Pfeile). Von einem ähnlichen Verhalten berichtet EIBL (1939): Er beob- achtete wie sich ein Fragment eines zentrifugierten Spirogyra-Chloroplastenbandes in ähnlicher Weise verla- gerte und sich sogar in dem für die betreffende Art eige- nen Anstellwinkel zur Zellwand anordnete.



Farbtafel, zusammengestellt aus Interferenz-Kontrast-Aufnahmen: A Immersionsaufnahme, 950 fach
B-G Aufnahmen mit 40 : 1 Objektiv, 390 fach

c) zur Energetik

Für die nach der Zentrifugation sofort einsetzende aktive Chloroplastenentfaltung kann die notwendige Energie sowohl aus der Photosynthese als auch aus der oxidativen Phosphorylierung bereitgestellt werden.

Bei der Analyse der photosynthetischen Teilreaktionen unter Einsatz von DCMU, DBMIB und Antimycin A und Einstrahlung von Weißlicht, Hellrot und Dunkelrot in Serienversuchen sowie andere Spektralbereiche in mehr punktuellen Versuchen unter anaeroben Bedingungen erwies sich eine Abhängigkeit von der zyklischen wie auch von der nicht-zyklischen Phosphorylierung. DCMU als Hemmstoff des nicht-zyklischen Elektronentransports blockiert in hohen Konzentrationen (10^{-5} M) den gesamten photosynthetischen Elektronentransport (ULLRICH 1971). Mit abnehmender DCMU-Konzentration wird in jedem Fall der Ablauf des zyklischen Elektronentransports um Photosystem I ermöglicht, da diese photosynthetische Teilreaktion weniger DCMU-empfindlich ist und durch Konzentrationen von $2,5 \times 10^{-6}$ M DCMU nicht beeinflusst wird (z.B. BEDELL & GOVINDJEE 1973). Da aber unter Einwirkung von 5×10^{-6} M und $2,5 \times 10^{-6}$ M DCMU nur im Weißlicht und Hellrot nicht aber im Dunkelrot, das bevorzugt Photosystem I anregt, eine Chloroplastenentfaltung erfolgt, war zunächst ausschließlich die nicht-zyklische Photophosphorylierung als energieliefernde Reaktion anzusehen. Die Unwirksamkeit dunkelroter Strahlung bei gleichzeitiger Behandlung mit $2,5 \times 10^{-6}$ M DCMU mußte zunächst als Negativ-Befund der zyklischen Phosphorylierung gelten. Polarographisch war durch die Einstrahlung von Wellenlängen > 700 nm eine erhebliche O_2 -Entwicklung meßbar, die aus der Anregung von Photosystem II resultiert. Der Nachweis der zyklischen Phosphorylierung konnte also nicht mit der selektiven Anregung von Photosystem I durch langwelliges Rotlicht (s.s. 47) geführt werden. Die Hemmwirkung von Antimycin A (s. Abb. 22 S. 62) ist unter gegebenen Ver-

suchsbedingungen als Nachweis einer zyklischen Phosphorylierung anzusehen.- Eine Erklärung der Reaktionshemmung im Dunkelrot unter gleichzeitiger Behandlung mit $2,5 \times 10^{-6}$ M DCMU ist in der Störung des zyklischen Elektronentransports um Photosystem I zu sehen. Vermutlich sind die Glieder der Elektronentransportkette auf der oxidierenden Seite von Photosystem I, etwa im Bereich des Plastochinon, überreduziert. Diese Überreduktion resultiert aus einer teilweisen, wenn auch nur geringen Elektronenzufuhr von Photosystem II, denn die polarographische O_2 -Messungen konnten die Anregung von Photosystem II durch Dunkelrot beweisen. Die Tatsache, daß in $2,5 \times 10^{-6}$ M DCMU unter Dunkelroteinstrahlung keine Sauerstoffanreicherung im Nährmedium gemessen werden konnte ist kein Beweis für die totale Blockierung von Photosystem II (s. dazu auch die Bemerkungen zur Methode der polarographischen Sauerstoffmessungen auf S. 59/60).

Aus der äußerst langsamen Bewegung ($0,2 \mu\text{m} - 0,8 \mu\text{m}$ pro Minute) und der niedrigen Lichtsättigung (400 Lux Weißlicht) kann auf einen geringen Energieumsatz während der Reaktion geschlossen werden.

Liegen auch inzwischen Ergebnisse vor, die einen Einfluß des Phytochromsystems auf die Photophosphorylierungsreaktionen vermuten lassen (THIBAUT & MICHEL 1974) und darüber hinaus auch chloroplastidäre Enzyme einer Regulierung durch Phytochrom unterliegen (MOHR 1972; BRÜNING et al. 1975), so können diese Wirkungen des Phytochroms doch keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Chloroplastenentfaltung haben.

d) der Faktor Licht und die Mechanik der Bewegung

Der oder die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Reaktion sind nach den vorliegenden Experimenten in der Mechanik zu suchen, im Bereich Chloroplast / Zellwand. Davon ausgehend, daß im Fall des "Stammes Erlangen" die Chloroplastenverankerung durch Hellrot gelockert werden

konnte, wurden Hellrotbestrahlungsexperimente durchgeführt, die zu den erwarteten Reaktionsbeschleunigungen führten. Es konnte nachgewiesen werden, daß Hellrot nicht über die Steuerung der energieliefernden Reaktionen wirksam ist, sondern die Mechanik beeinflußt.

HAUPT & TRUMP(1975) führen eine Reaktionsbeschleunigung der Induktionsbewegung des Mougeotia-Chloroplasten auf die Größe des gebildeten intrazellulären Phytochromgradienten zurück. Diese Vorstellung kann auf eine Langzeitreaktion wie die Chloroplastenentfaltung nach der Zentrifugation nicht übertragen werden, da im Dauerlicht kein wirksamer Phytochromgradient aufrecht erhalten werden kann.

Es wurden Experimente zum Nachweis eines möglichen Aktionsdichroismus durchgeführt. Diese Versuche mit polarisiertem Hellrot wie auch Dunkelrot verliefen negativ.

Daraus kann geschlossen werden, daß das für die reaktionsbeschleunigende Wirkung verantwortliche Phytochrom nicht mit dem des Kortikalplasmas identisch ist; es ist das Vorhandensein weiterer Phytochromanteile in der Mougeotia-Zelle zu fordern, die keine gerichtet~~e~~ Anordnung aufweisen.

Während beschleunigte Chloroplastenstreckungen durch Dauer-Hellrotbestrahlung stets erreicht wurden, waren die Reaktionen im Dauerdunkel wie auch im Dauer-Dunkelrot weniger konstant. Diese Ergebnisse fordern zu einem Deutungsversuch heraus.

Seit Jahren kann man unter gleichbleibenden Anzuchtbedingungen Unterschiede in den Zuwachsraten des Algenmaterials beobachten. Sieht man das Wachstum einer Zelle als das komplexeste Stoffwechselgeschehen an, dann sind damit auch sicher Schwankungen im intrazellulären Phytochromgehalt bei unterschiedlichem Zuwachs verbunden. In diesen wechselnden, jedoch quantitativ nicht faßbaren Parametern wie dem Gesamtphytochromgehalt der Zelle wird die Ursache der wechselnden Reaktionsgeschwindigkeiten

der Chloroplastenentfaltung als phytochromgesteuerte Reaktion gesehen. Legt man der reversiblen Umwandlung von P_r und P_{fr} durch saturierende HR- bzw. DR-Bestrahlungen die allgemeinen quantitativen Angaben zugrunde, die überwiegend aus in-vitro-Messungen resultieren, dann wird demnach durch Hellrot die Einstellung eines steady-state-Zustandes erreicht, das zu 80 % auf der Seite der P_{fr} -Form liegt. Dieser Phytochromform wird die reaktionsbeschleunigende Wirkung auf die Chloroplastenentfaltung zugeschrieben. In Abhängigkeit von der Wellenlänge erfolgt durch Dunkelroteinstrahlung eine Umstellung des Fließgleichgewichts, und zwar liegen bezogen auf die Wellenlänge 718 nm nur noch ca. 2,5 % P_{fr} vor. In beiden Fällen wird ein photo-steady-state eingestellt, u n a b h ä n g i g von den a b s o l u t e n Mengen des vorhandenen Phytochroms. Das beinhaltet für den Fall der Chloroplastenentfaltung, daß bei unterschiedlichen Phytochromgehalten verschieden hohe absolute P_{fr} -Mengen im steady-state-Zustand vorliegen. OELZE-KAROW et al. (1970) untersuchte die Induktion der Synthese des Enzyms Lipoxygenase. Die Auslösung der Enzymsynthese hängt vom absoluten P_{fr} -Gehalt ab und wird nach dem Alles-oder-Nichts-Mechanismus ausgelöst. Die absolute Menge an P_{fr} kann also für die Auslösung von Folgeprozeßketten entscheidend sein. Mougeotia-Zellen mit einem hohen Phytochromgesamtgehalt reagieren mit einer Reaktionsbeschleunigung, wohingegen bei niedrigem Phytochromgehalt durch Dunkelrot keine beschleunigte Reaktion gegenüber einem Weißlichtpräparat bewirkt werden kann, die wirksame P_{fr} -Menge unter steady-state-Bedingungen ist zu gering. Ein Alles-oder-Nichts-Mechanismus ist allerdings ausgeschlossen, da die Chloroplastenstreckungen in der Bewegungsgeschwindigkeit kontinuierliche Änderungen zeigten. Diese Aussage wird auch durch Experimente mit intermittierender HR- bzw. DR- Einstrahlung im Wechsel mit einer Dunkel-

phase unterstützt. Wird Hellrot als Dauerlicht gegeben, so geht man in der Phytochromforschung unter diesen Versuchsbedingungen von einer Abnahme des Phytochromgesamtgehalts aus; dieser Abbau (Destruktion) kann nur über die P_{fr} -Form erfolgen, da P_r die stabile Form des Phytochrom ist. Die Experimente dieser Arbeit führten zu der Schlußfolgerung, daß dem P_{fr} die reaktionsbeschleunigende Wirkung zukommt. Während der Destruktion des Phytochroms im Dauerlicht von maximal 6 Stunden wird jedoch niemals ein P_{fr} -Niveau unterschritten, da eine Verlangsamung der Reaktion zur Folge hätte. Bei intermittierender Einstrahlung von 2 Minuten Hellrot mit 48 Minuten Dunkelheit über eine Versuchsdauer von 6 Stunden ergibt zunächst durch die HR-Bestrahlung einen P_{fr} -Spiegel von ca. 80 %, der in Dunkelheit zu P_r revertiert wird; diese Reaktion erfolgt mit einer Halbwertszeit von 45 Minuten (Angabe bezogen auf 25 °C für Messungen am Senfkeimling). Nach 6 Stunden lägen demnach noch 5 % P_{fr} der ursprünglichen 80 % vor; in den Intermittierungsversuchen wird durch jede Hellrotphase das steady-state mit 80 % P_{fr} neu eingestellt.

e) Hemmstoffversuche zur Mechanik

Die Mechanik der Bewegung wurde unter Anwendung verschiedener Hemmstoffe untersucht. Die Beteiligung von Mikrotubuli an dieser Bewegung wie auch an der lichtorientierten Chloroplastendrehung kann ausgeschlossen werden (SCHÖNBOHM 1975). Dagegen unterstützen die Ergebnisse mit den Hemmstoffen PCMB und Cytochalasin B die Hypothese von der Beteiligung kontraktile Proteine nach Art des Aktomyosintyps. Da Aktinfilamente aus Algen isoliert werden konnten (PALEVITZ et al. 1974; WILLIAMSSÖN 1974), ist damit ihr Vorhandensein in dieser Pflanzengruppe bewiesen. Der direkte Nachweis von langen Filamenten dieser Art wie sie in den Internodialzellen von Characeen vorkommen erscheint für die Mougeotia-

Zelle recht unwahrscheinlich. Für die Drehung des Mougeotia-Chloroplasten um seine Längsachse sind lange Elemente nicht erforderlich; es ist eher an die Bildung kurzer, kontraktiler Elemente zu denken, die direkt am Chloroplasten angreifen und als Widerlager im Ektoplasma (Kortikalplasma) inserieren könnten. Deshalb erscheinen die von SCHÖNBOHM (1975) im differentiellen Interferenz-Kontrast beobachteten bei einsetzender Starklichtbewegung auftretender Strukturen als mögliche Elemente der Bewegungsmechanik. Nimmt^{man} weiterhin an, daß diese Strukturen erst unmittelbar vor Bewegungsbeginn ausdifferenziert werden, was bei Vorhandensein genügender mobiler Präkursoren vorausgesetzt werden darf, dann ist damit auch der fehlende Einfluß von Cytochalasin B auf die Haftfestigkeit des Chloroplasten vor der Zentrifugation zu erklären (SCHÖNBOHM 1975), denn noch nicht existierende Strukturen können in ihrer späteren Funktion auch nicht gehemmt werden. - PCMB lockert die Verankerung im Cytoplasma-Wandbelag. Obwohl PCMB als SH-Blocker auch in die Bewegungsmechanik bei zahlreichen Objekten eingreift ähnlich Cytochalasin B, muß der Mechanismus der Hemmung ein anderer sein. Als SH-Gruppen-Reagens kann es mit den Thiol-gruppen derjenigen Proteine reagieren -keine kovalente Bindung eingehen, sonst wäre es nicht durch einen SH-Gruppen-Überschuß wie hohe Cystein-Konzentrationen zu verdrängen- die sowohl die Verankerung der Chloroplasten bewirken als auch während der Chloroplastenbewegung nach der Zentrifugation aktiv sind. Wenn die spezifische Wirkung von Cytochalasin B auf kontraktile Proteine in ihrer Ausschließlichkeit angezweifelt wird, so kann sie doch im Fall der Chloroplastenentfaltung als Reaktion mit den Myosinbindungsstellen am Aktin (s. Abb. 28 D S. 74 und S. 76 Punkt 7) verstanden werden. SPUDICH & LIN (1972) zeigten in vitro die Hemmung der Myosinverankerung am Aktin durch Cytochalasin B. - Ein möglicher Membraneffekt von Cytochalasin B könnte in der Hemmung der Insertion der Strukturen

die am Chloroplasten einerseits und im Kortikalplasma andererseits inserieren, gesehen werden.- -

Anstoß zu weiteren Untersuchungen geben die unterschiedlichen Effekte von Hellrot und Dunkelrot sowohl auf die Beeinflussung der Chloroplastenverankerung im cytoplasmatischen Wandbelag als auch auf die Beeinflussung der Kinetik der Rückverlagerung des Chloroplasten.

Die Aussagen aus den Versuchen zur Energetik sprechen sowohl für eine Beteiligung der nicht-zyklischen als auch der zyklischen Photophosphorylierung; bei einem Vorgang wie der Chloroplastenentfaltung nach der Zentrifugation, der sehr wenig Energie benötigt, ist es sehr schwierig, die eigentliche Energieliefernde Reaktion herauszufinden. Vermutlich können alle ATP-synthetisierenden Reaktionen der Zelle das notwendige ATP liefern und sich in dieser Beziehung gegenseitig ersetzen.

Die Erstellung eines Wirkungsspektrums scheiterte an der Vielfalt der an der Gesamtreaktion beteiligten Photorezeptoren, deren "Einzelwirksamkeit" auf diese Reaktion beim derzeitigen Stand der Forschung nicht erfaßt werden kann.

Ich hoffe dennoch, mit diesen vorgetragenen Ergebnissen einen weiteren Beitrag zum Verständnis der komplexen Wechselbeziehungen zwischen dem Chloroplasten einerseits und dem Cytoplasma andererseits geliefert zu haben.

Zusammenfassung:

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten des durch Zentrifugation aufgefalteten Mougeotia-Chloroplasten in der lebenden Zelle untersucht. Die Versuche führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Vorversuche ergaben, daß die Haftfestigkeit des Chloroplasten im Cytoplasma-Wandbelag vor der Zentrifugation durch Außenfaktoren wie Temperatur, Dunkelheit und Licht beeinflußt werden kann. Für die beiden verwendeten Mougeotia-Stämme zeigte sich ein HR-DR-Antagonismus.
2. Die nach der Zentrifugation sofort einsetzende Reaktion des Chloroplasten, die zur vollständigen Entfaltung führt, ist eine aktive, intrazelluläre Bewegung.
3. Der Energiebedarf pro Zeiteinheit ist gering und kann sowohl aus der Photophosphorylierung als auch aus der oxidativen Phosphorylierung gedeckt werden.
4. Experimente mit den Photosynthesehemmstoffen DCMU, DBMIB und Antimycin A zeigten, daß sowohl die nicht-zyklische als auch die zyklische Photophosphorylierung die notwendige Energie bereitstellen können.
5. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch die Mechanik der Reaktion limitiert und kann über das Phytochromsystem beeinflußt werden.
6. Die Kinetiken der Chloroplastenentfaltungen können durch Licht beeinflußt werden: Hellrot bewirkt immer eine Reaktionsbeschleunigung, Dunkelrot und Dunkelheit in Abhängigkeit vom Zustand des Phytochromsystems, wobei dem absoluten P_{fr} -Niveau unter den jeweiligen steady-state-Bedingungen die reaktionsbeschleunigende Wirkung zugeschrieben wird.
7. Hemmstoffexperimente zur Untersuchung der Bewegungsmechanik schließen die Beteiligung von Mikrotubuli aus, dagegen wird die Hypothese von der Beteiligung aktiver Strukturen nach dem Prinzip kontraktiler Proteine unterstützt.

L i t e r a t u r

- Abe, S.: The Effect of p-Chloromercuribenzoate on Rotational Protoplasmic Streaming in Plant Cells
Protoplasma 58, 483-492 (1964)
- Bedell, G.W., Govindjee: Photophosphorylation in Intact Algae: Effects of Inhibitors, Intensity of Light, Electron Acceptors and Donors
Plant & Cell Physiol. 14, 1081-1097 (1973)
- Bock, G., W. Haupt: Die Chloroplastendrehung bei Mougeotia III. Die Frage der Lokalisierung des Hellrot-Dunkelrot-Pigmentsystems in der Zelle
Planta 57, 518-530 (1961)
- Böhme, H., S. Reimer, A. Trebst: The Effect of Dibromothymoquinone, an Antagonist of Plastoquinone, on Non-cyclic and Cyclic Electron Flow Systems in Isolated Chloroplasts
Z. Naturforsch. 26 b, 341-352 (1971)
- Bornefeld, T., W. Simonis: Effects of Light, Temperature, pH, and Inhibitors on the ATP Level of the Blue Green Alga Anacystis Nidulans
Planta 115, 309-318 (1974)
- Brüning, K., H. Drumm, H. Mohr: On the Role of Phytochrome in Controlling Enzyme Levels in Plastids
Biochem. Physiol. Pflanzen 168, 141-156 (1975)
- Carter, S.B.: Effect of Cytochalasins on Mammalian Cells
Nature 212, 261-264 (1967)
- Chen, J.C.W.: Observations of Protoplasmic Behavior and Motile Protoplasmic Fibrils in Cytochalasin B Treated Nitella Rhizoid
Protoplasma 77, 427-435 (1973)
- Eibl, K.: Das Verhalten des Spirogyra-Chloroplasten bei Zentrifugierung
Protoplasma 33, 73-102 (1939)
- Estensen, N.K., M. Rosenberg, J.D. Sheridan: Cytochalasin B Microfilaments and "Contractile" Processes
Science 173, 356-358 (1971)

- Fetzer, J.: Über die Beteiligung energieliefernder Stoffwechselprozesse an der lichtinduzierten Chloroplastenbewegung von Mougeotia
Z. Bot. 51, 468-506 (1963)
- Forer, A., J. Emmerson, O. Behnke: Cytochalasin B: Does it affect Actin-like Filaments ?
Science 175, 774-776 (1972)
- Frickel-Faulstich, B.: Veränderungen im photosynthetischen Elektronentransport einzelliger Grünalgen während des Entwicklungszyklus
Dissertation, Marburg 1974
- Gimmler, H., M. Avron: The Effect of Dibromothymoquinone on the Photosynthetic Electron Transport Reactions in Whole Cells of the Red Alga Porphyridium cruentum
In: Proc. 2nd Intern. Congress on Photosynthesis Research; G. Forti et al. (eds.)
W. Junck Publ., The Hague
- , —, S. Neimanis, I. Eilmann, W. Urbach: ¹⁴C-Photo-phosphorylation and Photosynthetic ¹⁴CO₂-Fixation during Synchronous Life Cycle of Ankistrodesmus braunii
Z. Pflanzenphysiol. 64, 358-366 (1971)
- Good, N.E., S. Izawa: Inhibition of Photosynthesis
In: Hochster, R.M. et al. (eds.): Metabolic Inhibitors 180-214
Academic Press New York, London 1973
- Gould, E.S., J.A. Bassham: Inhibitor Studies on the Photosynthetic Carbon Reduction Cycle in Chlorella pyrenoidosa
Biochim. Biophys. Acta 102, 9-19 (1965)
- Haupt, W.: Die Chloroplastendrehung bei Mougeotia:
1. Mitteilung: Über den quantitativen und qualitativen Lichtbedarf der Schwachlichtbewegung
Planta 53, 484-501 (1959)
- , — Die Orientierung der Phytochrommoleküle in der Mougeotia-Zelle: Ein neues Modell zur Deutung der experimentellen Befunde
Z. Pflanzenphysiol. 58, 331-346 (1968)

- Haupt, W.: Localization of Phytochrom within the Cell
In: Phytochrome, Mitrakos & W. Shropshire Jr. (eds.)
Academic Press, London and New York (1972)
- , - , G. Bock: Die Chloroplastendrehung bei Mougeotia:
IV. Die Orientierung der Phytochrom-Moleküle
im Cytoplasma
Planta 59, 38-48 (1962)
- , - , E. Schönbohm: Light-oriented Chloroplast Movements
In: Photobiology of Microorganisms 283-307
P. Halldal (ed.)
Wiley, London, New York, Sydney, Toronto 1970
- , - , K. Trump: Lichtorientierte Chloroplastenbewegung
bei Mougeotia: Die Größe des Phytochromgradienten
steuert die Bewegungsgeschwindigkeit
Biochem. Physiol. Pflanzen 168, 131-140 (1975)
- , - , M. Weisenseel: Physiological Evidence on the
Intracellular Localization of Phytochrome and
Localized Responses
Annual European Photomorphogenesis Symposium
University of Nottingham 1975
- Heber, U.: Metabolite Exchange between Chloroplasts and
Cytoplasm
Ann. Rev. Plant Physiol. 25, 393-421 (1974)
- , - , M.R. Kirk: Aufnahme und Umsatz exportierter
Photosyntheseprodukte durch die Chloroplasten
während der Assimilation von CO₂
Biochem. Physiol. Pflanzen 168, 211-223 (1975)
- Heldt, H.W., F. Sauer: The Inner Membrane of Chloroplasts
Envelope as the Site of Specific Metabolic
Transport
Biochim. Biophys. Acta 234, 83-91 (1971)
- , -- , -- , -- , L. Rapley: Differentiation of the
Permeability Properties of the two Membranes
of the Chloroplast Envelope
In: G. Forti et al. (eds.), 2nd Intern. Congress
on Photosynthesis Research 1345-1355 (1972)
W. Junk Publ., The Hague 1972

- Kouchkovsky, Y. de: Investigations on the photosynthetic electron and proton transfer reactions, and on chlorophyll fluorescence in chloroplasts an algae with the plastoquinone antagonist dibromothymoquinone (DBMIB)
In: M. Avron (ed.), Proc. 3rd Intern. Congress on Photosynthesis 1081-1093
Elsevier Scientific Publ. Comp. Amsterdam 1974
- Mannherz, H.G., R.H. Schirmer: Die Molekularbiologie der Bewegung
Chemie in unserer Zeit 4, 165-176 (1970)
- McIntosh, J.R.: The Axostyle of *Saccinobacculus*
II. Motion of Microtubule Bundle and a structural Comparison of straight and bent Axostyles
J. Cell Biol. 56, 324-339 (1973)
- Mohr, H.: Lectures on Photomorphogenesis
Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg, New York 1972
- Mooseker, M.S., L.G. Tilney: Isolation and Reactivation of the Axostyle: Evidence for a Dynein-like ATP-ase in the Axostyle
J. Cell Biol. 56, 13-26 (1973)
- Nakajima, H.: Some properties of a contractile protein in a myxomycete plasmodium
Protoplasma 52, 413-436 (1960)
- Neuscheler-Wirth, H.: Photomorphogenese und Phototropismus bei Mougeotia
Z. Pflanzenphysiol. 63, 238-260 (1970)
- Northen, H.T.: Studies of protoplasmic Structure in Spirogyra: I. Elasticity
Protoplasma 31, 1-8 (1938)
- , -- , R.T. Northen: Studies of protoplasmic structure in Spirogyra: II. Alteration of protoplasmic elasticity
Protoplasma 31, 9-19 (1938)
- Oelze-Karow, H., P. Schopfer, H. Mohr: Phytochrome-mediated repression of enzym synthesis (Lipoxygenase): A threshold phenomenon
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 65, 51-57 (1970)

- Palevitz, B.A.: Effect of Cytochalasin B on Stomatal Differentiation in Allium
J. Cell Biol. 55, 198 a (1972)
- , -- , J.F. Ash, P.K. Hepler: Actin in the green alga Nitella
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 363-366 (1974)
- Pfau, J.: Studien zur Chromatophorenbewegung der Braunalge Dictyota dichotoma
Dissertation Marburg 1974
- Pratt, L.H.: Spectral and photochemical properties of high-molecular-weight phytochrome
Annual European Photomorphogenesis Symposium
University of Nottingham 1975
- Rebhun, L.I.: Polarized Intracellular Particle Transport: Saltatory Movements and Cytoplasmic Streaming
Intern. Rev. Cytol. 32, 93-137 (1972)
- Schlüter, B.: Die Lageveränderung des Mougeotia-Chloroplasten in der lebenden Zelle nach erfolgter Zentrifugation
Marburg 1973, Staatsexamensarbeit
- , - , E. Schönbohm: Die Rückverlagerung des Mougeotia-Chloroplasten nach in-vivo Zentrifugation:
Eine intrazelluläre, aktive Bewegung
Ber. Deutsch. Bot. Ges. 87, 421-427 (1974)
- Schmidt, E.W.: Das Verhalten der Spirogyra-Zellen nach Einwirkung hoher Zentrifugalkräfte
Ber. Deutsch. Bot. Ges. 32, 35-47 (1914)
- Schönbohm, E.: Untersuchungen über die Starklichtbewegung des Mougeotia-Chloroplasten
Z. Bot. 51, 233-276 (1963)
- , - : Aktionsdichroismus bei der Starklichtbewegung des Chloroplasten von Mougeotia spec.
Ber. Deutsch. Bot. Ges. 81, 203-209 (1968)
- , - : Untersuchungen über den Einfluß von Photosynthesehemmstoffen und Halogeniden auf die Stark- und Schwachlichtbewegung des Chloroplasten von Mougeotia spec.
z. Pflanzenphysiol. 60, 255-269 (1969 a)
- , - : Die Hemmung der lichtinduzierten Bewegung des Mougeotia-Chloroplasten durch p-Chlormercuribenzoat (Versuche zur Mechanik der Chloroplastenbewegung)
Z. Pflanzenphysiol. 61, 250-260 (1969 b)

- Schönbohm, E.: Untersuchungen zur Steuerung und Mechanik der lichtorientierten Chloroplastenverlagerung bei der Zygnematalen Mougeotia spec.
Habilitationsschrift der Naturwissenschaftlichen Fakultät, Marburg 1970
- , - : Untersuchungen zum Photorezeptorproblem beim tonischen Blaulichteffekt der Starklichtbewegung des Mougeotia-Chloroplasten
Z. Pflanzenphysiol. 66, 20-33 (1971)
- , - : Die Wirkung von SH-Blockern sowie von Licht und Dunkel auf die Verankerung der Mougeotia-Chloroplasten im cytoplasmatischen Wandbelag
2. Mitteilung: Zur Mechanik der Chloroplastenbewegung
Z. Pflanzenphysiol. 66, 113-132 (1972)
- , - : Kontraktile Fibrillen als aktive Elemente bei der Mechanik der Chloroplastenverlagerung
Ber. Deutsch. Bot. Ges. 86, 407-422 (1973 a)
- , - : Die lichtinduzierte Verankerung der Plastiden im cytoplasmatischen Wandbelag: Eine phytochromgesteuerte Kurzzeitreaktion
Ber. Deutsch. Bot. Ges. 86, 423-430 (1973 b)
- , - : Der Einfluß von Colchicin sowie von Cytochalasin B auf fädige Plasmastrukturen, auf die Verankerung der Chloroplasten sowie auf die orientierte Chloroplastenbewegung
Ber. Deutsch. Bot. Ges. 88, 211-224 (1975)
- , - , W. Haupt: Lichtorientierte Chloroplastenbewegung bei Mougeotia spec.
Institut für den Wissenschaftlichen Film
Göttingen 1975
Wissenschaftlicher Film B 1146/1975
- Seitz, K.: Über den Mechanismus der lichtinduzierten Orientierungsbewegung der Chloroplasten
Ber. Deutsch. Bot. Ges. 83, 193-198 (1970)
- , - : Die Ursache der Phototaxis der Chloroplasten: Ein ATP-Gradient ?
(Versuche zum Primärprozeß der Starklichtbewegung bei Vallisneria)
Z. Pflanzenphysiol. 64, 241-256 (1971)
- Simonis, W.: Zyklische und nichtzyklische Photophosphorylierung in vivo
Ber. Deutsch. Bot. Ges. 80, 395-402 (1967)

- Smith, F.A.: Links between Glucose Uptake and Metabolism in Nitella translucens
J. Exp. Bot. 18, 348-358 (1967)
- Senn, G.: Die Gestalts- und Lageveränderung der Pflanzen-Chromatophoren
Leipzig 1908, Wilhelm Engelmann
- Spooner, B.S., K.M. Yamada, N.K. Wessels: Microfilaments and Cell Locomotion
J. Cell Biol. 49, 595-613 (1971)
- Spudich, J.A., S. Lin: Cytochalasin B, its Interaction with Actin and Actomyosin from Muscle
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 442-446 (1972)
- Syrett, P.J.: The kinetics of Isocitrate Lyase Formation in Chlorella: Evidence for the Promotion of Enzyme Synthesis by Photophosphorylation
J. Exp. Bot. 17, 641-654 (1966)
- Tanner, W., L. Dächsel, O. Kandler: Effects of DCMU and Antimycin A on photoassimilation of glucose in Chlorella
Plant Physiol. 40, 1151-1156 (1965)
- Tazawa, M.: Motive Force of Cytoplasmic Streaming in Nitella
Protoplasma 65, 207-222 (1968)
- Thibault, P., A. Michel: Analysis of Photosynthetic Induction Phenomena in Zea Mays under anaerobic Conditions: ATP Synthesis and Fluorescence Changes
In: M. Avron (ed.) Proc. 3rd Intern. Congress on Photosynthesis Res. 957-966
Elsevier Scientific Publ. Com. Amsterdam 1974
- Trebst, A., E. Harth, W. Draber: On a new inhibitor of photosynthetic electron-transport in isolated chloroplasts
Z. Naturforschg. 25 b, 1157-1159 (1970)
- , --, G. Hauska: Energiekonservierung in der photosynthetischen Membran der Chloroplasten
Naturwissenschaften 61, 308-316 (1974)
- Ts'o, P.O.P., L. Eggman, J. Vinograd: The isolation of myxomyosin, an ATP-sensitive protein from the plasmodium of a myxomycete
J. Gen. Physiol. 39, 325-347 (1956)

- Ullrich, W.R.: Nitratabhängige nichtzyklische Photophosphorylierung bei Ankistrodesmus braunii in Abwesenheit von CO_2 und O_2
 Planta 100, 18-30 (1971)
- , - , W. Simonis: Die Bildung von Polyphosphaten bei Ankistrodesmus braunii durch Photophosphorylierung im Rotlicht 683 nm und 712 nm unter Stickstoffatmosphäre
 Planta 84, 358-367 (1969)
- Urbach, W., H. Gimpler: Photophosphorylierung und photosynthetische $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung in vivo. I. Vergleich von cyclischer und nichtcyclischer Photophosphorylierung mit der photosynthetischen CO_2 -Fixierung
 Z. Pflanzenphysiol. 62, 276-286 (1970)
- , - , W. Kaiser: Changes of ATP levels in green algae and intact chloroplasts by different photosynthetic reactions
 In: G. Forti et al. (eds.) Proc. 2nd Inter. Cong. on Photosynthesis Res. 1401-1411
 W. Junck Publ., The Hague 1972
- , - , W. Simonis: Inhibitor studies on the photophosphorylation in vivo by unicellular algae (Ankistrodesmus) with Antimycin A, HOQNO, Salicylaldoxim, and DCMU
 Biochem. Biophys. Res. Com. 17, 39-45 (1964)
- Virgin, H.I.: The effect of light on the protoplasmic viscosity
 Physiol. Plantarum 4, 255-353 (1951)
- , - - : An action spectrum for the light induced changes in the viscosity of plant protoplasm
 Physiol. Plantarum 5, 575-582 (1952)
- , - - : Further studies of the action spectrum for light-induced changes in the protoplasmic viscosity of Helodea densa
 Physiol. Plantarum 7, 343-353 (1954)
- Voerkel, H.S.: Untersuchungen über die Phototaxis der Chloroplasten
 Planta 21, 156-205 (1934)

- Wagner, G., W. Haupt, A. Laux: Reversible Inhibition of Chloroplast movement by Cytochalasin B in the Green alga Mougeotia
Science 176, 808-809 (1972)
- Waris, H.: The significance for algae of chelating substances in the nutrient solutions
Physiol. Plantarum 6, 538-543 (1953)
- Warner, F.D., P. Satir: The substructure of ciliary microtubules
J. Cell Sci. 12, 313-326 (1973)
- Weisenseel, M.: Vergleichende Untersuchungen zum Einfluß der Temperatur auf die lichtinduzierte Chloroplastenverlagerung I. Die Wirkung verschiedener Lichtintensitäten auf die Chloroplastenanordnung und ihre Abhängigkeit von der Temperatur
Z. Pflanzenphysiol. 59, 56-69 (1968)
- , -, E. Smeibidl: Phytochrome controls Water Permeability in Mougeotia
Z. Pflanzenphysiol. 70, 420-431 (1973)
- Wessels, N.K., B.S. Spooner, J.F. Ash, M.O. Bradley, M.A. Lu-
duena, E.L. Taylor., J.T. Wrenn, K.M. Yamada:
Microfilaments in cellular and developmental
processes
Science 171, 135-143 (1971)
- Williamson, R.E.: A Light-Microscope Study of the Action of Cytochalasin B on the Cells and isolated Cytoplasm of the Characeae
J. Cell Sci. 10, 811-819 (1972)
- , - - : Actin in the alga Chara corallina
Nature 248, 801-802 (1974)
- Zurzycki, J.: Studies on the centrifugation of chloroplasts in Lemna trisulca
Acta Soc. Bot. Polon. 29, 385-393 (1960)

Die vorliegende Arbeit entstand im Fachbereich
Biologie der Philipps-Universität Marburg.
Die Experimente wurden in der Zeit von Herbst 1973
bis Dezember 1975 durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr.
E. Schönbohm für die Themenstellung sowie die
Betreuung und Förderung der Arbeit danken.
Darüber hinaus gilt mein Dank allen Fachbereichs-
angehörigen, die mich mit Rat und Tat in so vielen
kleinen Dingen unterstützt haben, insbesondere
Herrn G. Vobis, der mir bei der Anfertigung einiger
Zeichnungen behilflich war.

In der Zeit von September 1973 bis Februar 1976
erhielt ich ein Stipendium nach dem Graduierten-
Förderungsgesetz (GFG) in der Gesamthöhe von
23 101,74 DM aus Mitteln des Landes und des Bundes;
auch dafür möchte ich mich bedanken.

Am 22. September 1948 wurde ich als fünftes Kind der Eheleute Josef Schlüter und Maria, geb. Schmücker in Rüthen/Westfalen geboren.

Von Ostern 1955 bis 1959 besuchte ich die Volksschule meines Heimatortes Kneblinghausen, wo meine Eltern einen landwirtschaftlichen Betrieb bewirtschaften.

Von 1959 bis 1963 war ich Schüler der Städtischen Realschule in Lippstadt. Ostern 1963 wechselte ich zum Staatlichen Aufbaugymnasium Rüthen, wo ich im Juli 1967 die Reifeprüfung ablegte.

Seit dem Wintersemester 1967/68 studierte ich die Fächer Biologie und Chemie an der Philipps-Universität Marburg mit dem Studienziel Staatsexamen, das ich im Juni 1973 ablegte.

Dank der Gewährung eines Promotionsstipendiums nach dem Graduiertenförderungsgesetz war es mir möglich, die in der Staatsexamensarbeit begonnenen experimentellen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit fortzuführen.

